

**POTENSI BAKTERI ASAL KOMPOS SAPI SEBAGAI
ANTAGONIS PATOGEN *Ralstonia solanacearum* PADA
TANAMAN TOMAT (*Solanum lycopersicum*) SECARA *In vitro***

**Oleh :
TRIA NURYANI**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERTANIAN
MALANG
2018**

**POTENSI BAKTERI ASAL KOMPOS SAPI SEBAGAI
ANTAGONIS PATOGEN *Ralstonia solanacearum* PADA
TANAMAN TOMAT (*Solanum lycopersicum*) SECARA *In vitro***

OLEH

TRIA NURYANI

145040201111175

**PROGRAM STUDI AGROEKOTEKNOLOGI
MINAT PERLINDUNGAN TANAMAN**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh

Gelar Sarjana Pertanian Strata Satu (S-1)

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

FAKULTAS PERTANIAN

JURUSAN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

MALANG

2018




LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Penelitian : Potensi Bakteri Asal Kompos Sapi sebagai Antagonis
Patogen *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Tomat
(*Solanum lycopersicum*) secara *In vitro*.
Nama Mahasiswa : Tria Nuryani
NIM : 145040201111175
Jurusan : Hama Penyakit Tumbuhan
Program Studi : Agroekoteknologi

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,


Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP.
NIP. 19771130 200501 1 002
Antok Wahyu Sektiono, SP., MP.
NIP 201304 841014 1 001

Diketahui,

Ketua Jurusan
Hama dan Penyakit Tumbuhan,Dr. Ir. Ludi Pantja Astuti, MS.
NIP 19551018 198601 2 001

Tanggal Persetujuan :

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan

MAJELIS PENGUJI

Penguji I



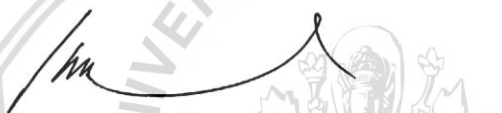
Dr. Ir. Toto Himawan, SU.
NIP.19551119 198303 1 002

Penguji II



Antok Wahyu Sektiono, SP., MP.
NIP. 201304 841014 1 001

Penguji III



Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP.
NIP. 19771130 200501 1 002

Penguji IV



Dr. Ir. Mintarto Martosudiro, MS.
NIP. 19590705 198601 1 003

Tanggal Lulus : 31 OCT 2018



PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa segala pernyataan dalam skripsi ini merupakan hasil penelitian saya sendiri, dengan bimbingan komisi pembimbing. Skripsi tidak pernah diajukan untuk memperoleh gelar di Perguruan Tinggi manapun dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang dengan jelas ditunjukkan rujukan dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Malang, 2 Oktober 2018

Tria Nuryani



RINGKASAN

Tria Nuryani. 145040201111175. Potensi Bakteri asal Kompos Sapi sebagai Antagonis Patogen *Ralstonia solanacearum* pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum*) secara *In vitro*. Dibawah bimbingan Bapak Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP., sebagai Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Antok Wahyu Sektiono, SP., MP. sebagai Dosen Pembimbing Pendamping.

Pengendalian penyakit tanaman menggunakan agen antagonis lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia seperti fungisida dan sejenisnya. Salah satu penyakit penting tanaman yang menyebabkan penurunan hasil panen yaitu, layu bakteri pada tanaman tomat yang disebabkan oleh patogen *Ralstonia solanacearum*. Dari beberapa penelitian, bakteri antagonis mampu menghambat patogen *Ralstonia solanacearum*, yaitu seperti genus *Coryneform*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, dan *Pantoea*. Ditemukan beberapa genus bakteri asal kompos kerbau belang yang dapat menghambat patogen *Ralstonia solanacearum*.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2018 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Tahapan penelitian yaitu : 1) Eksplorasi bakteri dari kompos sapi, 2) Seleksi bakteri dari kompos sapi yang mampu menjadi antagonis *Ralstonia solanacearum*, 2) Identifikasi bakteri yang mampu menjadi antagonis. Tahap uji antagonis dilakukan secara *In vitro* menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan yaitu 3 perlakuan bakteri, dan 1 kontrol. Setiap perlakuan diulang sebanyak 6 ulangan. Variabel yang diamati yaitu, karakterisasi bakteri, dan penghambatan bakteri antagonis terhadap patogen *Ralstonia solanacearum*.

Hasil penelitian didapatkan 3 bakteri yang merupakan bakteri antagonis, dan mampu menghambat patogen *Ralstonia solanacearum*. Tiga bakteri yang merupakan antagonis yaitu kode S13, S14, dan S18. Uji penghambatan dilakukan secara *In vitro*, dengan metode pengkabutan. Pengujian antagonis pada media NA menunjukkan 3 bakteri uji menghasilkan zona hambat yang menunjukkan ada penghambatan terhadap bakteri patogen. Dari 3 perlakuan bakteri antagonis, dan 1 kontrol menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata. Zona hambat tertinggi yaitu pada bakteri S13. 3 bakteri antagonis yang ditemukan diidentifikasi untuk menentukan genusnya. Bakteri S13 merupakan

genus *Xanthomonas* sp, bakteri S18 belum teridentifikasi maka perlu dilakukan uji lanjutan, bakteri S14 merupakan bakteri genus *Pantoea* sp.



SUMMARY

Tria Nuryani. 145040201111175. Potential of Bacteria from Cattle Compost as Pathogen Antagonist of *Ralstonia solanacearum* on Tomato (*Solanum lycopersicum*) Plant in vitro. Supervised by Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP., as chief supervisor and Antok Wahyu Sektiono, SP., MP. As co-supervisor.

Control of plant diseases using antagonist agents is more environmentally friendly by using chemicals such as fungicides and the like. One important disease that produces yields is organic vegetation in plants guided by the pathogen *Ralstonia solanacearum*. From several studies, antagonistic bacteria were able to inhibit the pathogen *Ralstonia solanacearum*, namely genera *Coryneform*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, and *Pantoea*. Found several genera of bacteria from striped buffalo compost that can inhibit the pathogen *Ralstonia solanacearum*.

The study was conducted in March to August 2018 at the Laboratory of Plant Diseases, Department of Plant Pests and Diseases, Faculty of Agriculture, Brawijaya University, Malang. The stages of the research are: 1) Exploration of bacteria from cow compost, 2) Bacterial selection from cow compost which becomes the antagonist of *Ralstonia solanacearum*, 2) Identification of bacteria that become antagonists. The antagonistic test stage was carried out in vitro using RAW with 4 chambers, namely 3 hours of bacteria, and 1 control. Each treatment was repeated 6 replications. Observing variables are bacterial characterization, and inhibition of antagonistic bacteria against pathogen *Ralstonia solanacearum*.

The results of the study found 3 bacteria which are antagonistic bacteria, and capable of inhibiting the pathogen *Ralstonia solanacearum*. Three antagonistic bacteria, namely code S13, S14, and S18. The inhibition test was carried out in vitro, by means of fading. Antagonistic testing on NA media showed that 3 test bacteria produced inhibitory zones which showed that there were inhibitions of pathogenic bacteria. Of the 3 oral antagonistic bacteria, and 1 control showed very different results. The highest inhibition zone in S13 bacteria. 3 antagonistic bacteria found to determine the genus. S13 bacteria is the genus of *Xanthomonas* sp, S18 bacteria have not been identified so it needs to be tested, the S14 bacteria is the genus *Pantoea* sp.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkah rahmat dan karunia-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan Judul “Potensi Bakteri asal Kompos Sapi sebagai Antagonis Patogen *Ralstonia Solanacearum* pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum*) secara *In vitro*” Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Anton Muhibuddin, SP., MP. selaku dosen pembimbing utama yang telah membimbing, mengarahkan serta memberi saran dan kritikan yang membangun bagi penulis.
2. Bapak Antok Wahyu Sektiono, SP., MP. selaku dosen pembimbing kedua yang telah membimbing, mengarahkan serta memberi saran dan kritikan yang membangun bagi penulis.
3. Ibu Dr. Ir. Ludji Pantja Astuti, MS. selaku Ketua Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan.
4. Para laboran dan staff administrasi yang telah banyak membantu penulis selama melakukan penelitian dan mengurus administrasi.
5. Ibu, Bapak, Kakak, serta keluarga besar dan teman-teman yang selalu memberi dukungan moril dan semangat.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan baik dari segi materi, maupun tatanan bahasanya. Oleh karena itu, kritik dan saran sangat diharapkan penulis untuk bisa lebih baik lagi. Semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi seluruh pembaca yang membutuhkan informasi.

Malang, 2 Oktober 2018

Tria Nuryani

RIWAYAT HIDUP

Penulis adalah putri kedua dari Bapak Sadar dan Ibu Surti. Penulis lahir pada tanggal 17 Juli 1996 di Kabupaten Magetan, Jawa Timur. Riwayat pendidikan penulis tercatat sebagai alumni Taman kanak-kanak Pembangunan 1 Summersawit, Magetan. Pendidikan sekolah dasar di SDN Summersawit 2 tahun 2002-2008. Pendidikan sekolah menengah pertama di SMPN 2 Magetan tahun 2008-2011. Kemudian melanjutkan sekolah menengah atas di SMAN 1 Plaosan, Magetan pada tahun 2011-2014. Penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Brawijaya pada tahun 2014, sebagai mahasiswa Fakultas Pertanian Program Studi Agroekoteknologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan.



DAFTAR ISI

RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	iv
RIWAYAT HIDUP	v
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian	2
1.4. Hipotesis	3
1.5. Manfaat	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Bakteri	4
2.2. Isolasi dan Identifikasi Bakteri	6
2.2. Patogen <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
2.3. Bakteri Antagonis Tanaman	8
2.4. Bahan organik	9
III. METODOLOGI	11
3.1. Tempat dan Waktu	11
3.2. Alat dan Bahan	11
3.3. Metode Penelitian	11
3.4. Pelaksanaan Penelitian	11
3.4.1. Pengambilan Kompos Sapi	11
3.4.2. Pembuatan Media Tumbuh Bakteri	11
3.4.3. Isolasi	12

3.4.5. Seleksi Bakteri Antagonis	12
3.4.6. Uji Hipersensitif	13
3.4.7. Identifikasi.....	13
3.4.6. Uji Antagonis Secara <i>In Vitro</i>	15
3.5. Variabel pengamatan	17
3.5. Analisis Data	18
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Identifikasi dan Pemurnian <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
4.2. Eksplorasi Bakteri Antagonis dari Kompos Sapi	20
4.3. Seleksi Bakteri yang Berpotensi Antagonis terhadap <i>Ralstonia solanacearum</i>	21
4.4. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Terseleksi.....	23
4.4.1. Karakterisasi Morfologi	23
4.4.2. Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia.....	25
4.4.3 Hasil Identifikasi Bakteri.....	31
4.5. Uji Antagonis secara <i>In vitro</i>	33
V. PENUTUP	36
5.1. Kesimpulan	36
5.2. Saran	36
DAFTAR PUSTAKA.....	37
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
1.	Bakteri bentuk coccus.....	5
2.	Bakteri bentuk batang	5
3.	Bakteri bentuk spiral	6
4.	Koloni <i>R. solanacearum</i> pada media TZC.....	7
5.	Uji antagonis terhadap <i>R. solanacearum</i>	17
6.	Koloni <i>R. solanacearum</i> umur 24 jam pada media NA	19
7.	Koloni Ralstonia pada media TZC.....	20
8.	Bakteri hasil pengenceran tingkat 8 pada media NA	20
9.	Pertumbuhan tiap-tiap bakteri hasil eksplorasi pada media NA yang ditumbuhi patogen <i>R. solanacearum</i>	22
10.	Kenampakan koloni bakteri S13	23
11.	Kenampakan koloni bakteri S14	24
12.	Kenampakan koloni bakteri S18	24
13.	Uji hipersensitif pada daun tembakau	25
14.	Hasil uji KOH gram negatif menghasilkan lendir	26
15.	Sel batang bakteri pada perbesaran 100x.....	27
16.	Hasil uji Okdidatif-Fermentatif	27
17.	Koloni bakteri <i>Pantoea</i> sp berwarna kuning pada media YDC	29
18.	Uji koloni kuning pada media YDC.....	29
19.	Koloni bakteri <i>Xanthomonas</i> sp tumbuh pada suhu 33°C.....	30
20.	Uji katalase positif menghasilkan gelembung.....	30
21.	Hasil uji bakteri antagonis terhadap <i>R. solanacearum</i>	34

Lampiran

1.	Uji KOH 3%	41
2.	Bentuk sel bakteri pada mikroskop	41
3.	Uji antagonisme pada <i>Ralstonia solanacearum</i>	42
4.	Uji katalase menunjukkan ketiga bakteri hasil positif.....	42
5.	Uji hipersensitif menggunakan tanaman tembakau	43
6.	Uji oksidatif-fermentatif	44
7.	Koloni bakteri pada mikroskop	44
8.	Diagram identifikasi bakteri hingga tingkat genus	45

DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
1.	Perlakuan uji antagonis.....	16
2.	Bakteri hasil seleksi antagonis	21
3.	Karakteristik morfologi bakteri antagonis.....	24
4.	Karakterisasi fisiologi dan biokimia	31
5.	hasil identifikasi bakteri terseleksi	32
6.	Hasil pengujian antagonis	33

Lampiran

1.	Anova hasil analisis rata-rata indeks daya hambat antagonisme	41
----	---	----



I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pengendalian penyakit tanaman menggunakan agen antagonis lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan penggunaan bahan kimia seperti fungisida dan sejenisnya. Sejumlah mikroorganisme telah dilaporkan dalam berbagai penelitian ternyata efektif sebagai agen pengendalian hayati hama dan penyakit tumbuhan, diantaranya adalah dari genus *Bacillus*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, dan *Verticilum* (Hasanuddin, 2003).

Dalam tanah yang sehat dan kaya akan bahan organik, banyak mikroba yang hidup dari bahan organik tersebut. Bahan organik memiliki peran penting bagi tanaman sebagai nutrisi, dan mengandung sejumlah mikroba seperti bakteri, jamur, dan kapang. Mikroba ini membantu dalam memecah residu organik menjadi bagian yang lebih sederhana selama proses pengomposan terjadi (Kuswinanti *et al.*, 2014). Populasi dan aktivitas mikroorganisme dapat ditingkatkan dengan bahan organik (Muhibuddin *et al.*, 2011). Kompos sapi tidak 100% hanya dari kotoran sapi, namun juga tercampur dengan sisa makanan serta alas tidur sapi yang merupakan berasal dari tumbuhan. Berdasarkan dari penelitian Kuswinanti *et al.* (2014) telah ditemukan beberapa genus bakteri asal kompos/bahan organik kerbau yang dapat menghambat *R. solanacearum*. Beberapa genus tersebut yaitu *Coryneform*, *Bacillus*, *Clostridium*, dan *Pantoea*. Dari penelitian Mohamed *et al.* 2017 juga berhasil mengisolasi bakteri antagonis dari kompos yang mampu menghambat patogen tular tanah, yaitu dari genus *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, and *Rummeliibacillus*. Beberapa bakteri antagonis tersebut mampu menghasilkan antibiosis untuk menghambat patogen musuh. Genus *Bacillus* menghasilkan senyawa antimicroba peptida, dan beberapa senyawa antipeptida seperti poliketida, aminosugar, dan fosfolipid yang mampu menjadi biokontrol dari beberapa patogen tanaman, (Zhao *et al.*, 2014). Pada genus *Pantoea* sp dalam menghambat patogen tanaman mengeluarkan senyawa antibiosis, senyawa antibiosis yang dihasilkan oleh *Pantoea* sp yaitu herbicolins, pantocin, dan microcin (Dutkiewicz *et al.*, 2016)

Dalam penelitian yang telah dilakukan Kuswinanti *et al.* (2014) bakteri antagonis asal kompos kerbau mampu menghambat *Ralstonia solanacearum*. Patogen *R. solanacearum*, merupakan patogen tular tanah yang menyerang tanaman tomat menyebabkan penyakit layu bakteri. Beberapa bakteri antagonis

terbukti mampu menghambat patogen *R. solanacearum*. Dalam penelitian Rahman *et al.* (2013) bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mampu menjadi antagonis *R. solanacearum*. Genus lain seperti *Bacillus*, dan *Streptomyces* juga mampu dalam menghambat *R. solanacearum* (Rai *et al.*, 2017).

Penelitian bakteri antagonis dari kompos/bahan organik masih sangat jarang dilakukan. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi bakteri dari kompos/ bahan organik sebagai antagonis. Dilakukan eksplorasi untuk menemukan bakteri yang berpotensi sebagai antagonis patogen *R. solanacearum* dari kompos sapi yang sebelumnya belum dimanfaatkan. Penelitian dilakukan untuk mendapat bakteri antagonis pada kompos sapi yang dapat berasosiasi dengan tanaman, yang mampu menghambat patogen *R. solanacearum*. Sehingga dapat diketahui bahwa didalam kompos sapi yang biasa digunakan sebagai pupuk organik, terdapat bakteri penghambat patogen *R. solanacearum* atau tidak. Dengan adanya penelitian ini diharapkan dapat menjadi solusi untuk mengendalikan penyakit layu bakteri tanaman tomat, sehingga dapat meningkatkan produktivitas tanaman tomat, dengan biaya yang minimal karena kompos dari sapi akan mudah didapat.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Apakah terdapat bakteri dari kompos sapi yang berpotensi sebagai antagonis patogen *R. solanacearum*?
2. Bagaimana kemampuan bakteri dari kompos sapi dalam menghambat patogen *R. solanacearum* secara *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui jenis bakteri dari kompos sapi yang berpotensi sebagai antagonis patogen *R. solanacearum*
2. Mengetahui kemampuan bakteri dari kompos sapi dalam menghambat patogen *R. solanacearum*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dari penelitian ini adalah

1. Bahwa dalam kompos sapi terdapat bakteri yang mampu menjadi antagonis patogen *R. solanacearum*
2. Bakteri antagonis dalam kompos sapi mampu dalam menghambat patogen *R. solanacearum*

1.5. Manfaat

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah mengetahui potensi bakteri dari kompos sapi dalam menghambat patogen *R. solanacearum*, dan memberi informasi kepada masyarakat khususnya petani mengenai solusi untuk mengendalikan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat dengan menggunakan bakteri yang berasal dari kompos sapi.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri merupakan makhluk hidup yang memiliki ukuran mikroskopis, berasal dari kata "*bakterion*" (bahasa Yunani) yang berarti tongkat atau batang. Bakteri adalah makhluk hidup dengan sel tunggal (uniseluler), dengan ukuran rata-rata 0,5 sampai beberapa mikron. Bakteri memiliki berbagai bentuk diantaranya bentuk bulat (*coccus*), batang (*basil*), spiral. Perkembangbiakan yang dilakukan oleh bakteri yaitu dengan cara membelah diri dari satu sel menjadi dua sel (Tjahjedi, 1989).

Bakteri adalah makhluk hidup yang tidak memiliki membran, sehingga masuk ke dalam kelompok prokariotik. Klasifikasi dari bakteri dibedakan berdasarkan komponen dinding sel, terbagi menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Komponen utama penyusun dinding sel bakteri negatif adalah lipid, sedangkan pada bakteri gram positif adalah karbohidrat dan protein yang disebut dengan peptidoglikan (Muwarni, 2015). Bakteri gram positif mempunyai peptidoglikan terletak di luar membran plasma, sedangkan bakteri gram negatif memiliki peptidoglikan terletak antara membran plasma dan membran luar dan jumlahnya pun sedikit. Adanya dinding sel yang terdapat pada bakteri ini mengakibatkan bakteri memiliki bentuk yang tetap (Fifendy dan Biomed, 2017).

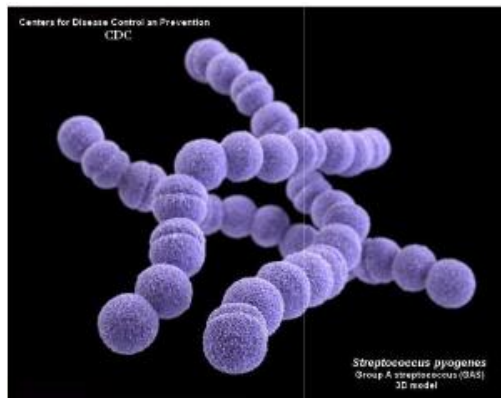
Bakteri adalah salah satu golongan organisme prokariotik (tidak memiliki selubung inti), memiliki informasi genetik berupa DNA, namun tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. Bentuk DNA dari bakteri sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid.

Bakteri dapat ditumbuhkan dalam suatu medium agar dan akan membentuk koloni. Koloni sel bakteri merupakan sekelompok sel yang dapat dilihat dengan mata langsung. Penampakan bakteri pada media lempeng agar akan menunjukkan bentuk dan ukuran koloni yang khas, dapat dilihat dari bentuk keseluruhan, kenampakan koloni, tepi dan permukaan koloni. Koloni dari bakteri dapat berbentuk bulat, tak beraturan dengan permukaan cembung, cekung atau datar serta tepi koloni rata atau bergelombang dsb.

Menurut Adam (1995), berdasarkan morfologi bentuknya bakteri terbagi menjadi 3 bagian, antara lain:

- a. Bentuk *coccus* (Bulat)

Bentuk *coccus* adalah bakteri yang memiliki morfologi bola-bola kecil.

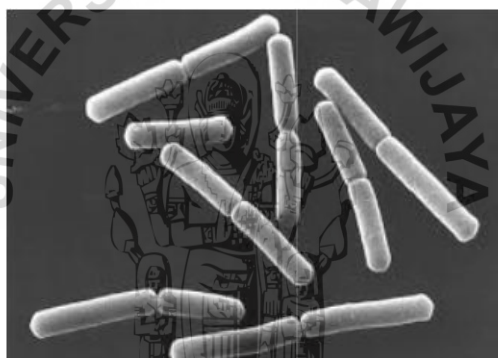


Gambar 1. Bakteri bentuk coccus

Sumber : <http://www.generasibiologi.com>

b. Bentuk Basil (*Bacillus*)

Basil berbentuk seperti tongkat pendek, agak silindris. Selain itu bentuk dari sebagian besar bakteri adalah bentuk basil.



Gambar 2. Bakteri bentuk batang

Sumber : <http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>

c. Bentuk Spiral

Bentuk spiral adalah bakteri yang memiliki bentuk panjang dan berbengkok-bengkok. Dibandingkan dengan bakteri yang memiliki bentuk coccus dan basil, bakteri bentuk spiral tidak memiliki jumlah yang banyak.



Gambar 3. Bakteri bentuk spiral

Sumber : <http://www.gettyimages.com>

2.2. Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Isolasi merupakan proses pemisahan mikroorganisme dari lingkungan alami, ditumbuhkan pada medium buatan untuk mendapatkan kultur murni. Teknik pemisahan mikroorganisme dari lingkungan alami untuk mendapatkan kultur.

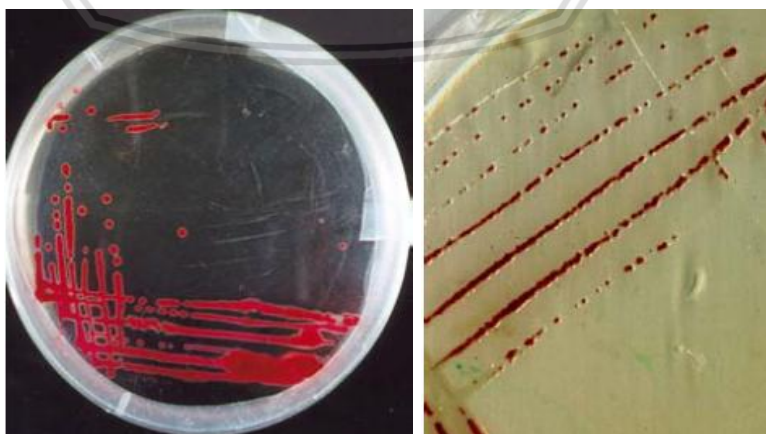
Identifikasi dan karakterisasi bakteri dilakukan berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994). Pengamatan morfologi isolat bakteri yang diperhatikan, meliputi bentuk koloni, warna koloni, tepi koloni, ukuran koloni, morfologi permukaan koloni, serta morfologi sel bakteri yang diamati dibawah mikroskop dan sifat gram bakteri dilakukan untuk mengelompokkan isolat yang diperoleh (Fanani *et al.*, 2015). Identifikasi dilakukan melalui serangkaian pengujian biokimia dan pengamatan, dari uji gram, uji katalase, uji OF.

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Bakteri dimaksudkan adalah bakteri sebagian besar terlibat dalam infeksi mikroba. Infeksi bakteri tersebut dapat diidentifikasi dengan sifat yang berbeda dari mikroorganisme ini. Bakteri mengandung beberapa sifat yang melekat. Dengan menggunakan sifat-sifat ini kita dapat membedakan, dapat mengecek ada dan tidak adanya mikroorganisme tersebut, dapat melihat gram negatif dan gram positif dari mikroorganisme dan lain sebagainya. Setiap uji biokimia bertujuan untuk memperlihatkan perbedaan dari bakteri (Hemraj *et al.*, 2013).

2.2. Patogen *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum termasuk kelompok bakteri Gram negatif, morfologi sel berbentuk batang pendek, sel tunggal berukuran 0,5–0,7 x 1,5–2,0 μm , tidak membentuk spora, membentuk koloni berlendir berwarna putih, bergerak dengan menggunakan flagela tunggal atau lebih yang terletak pada salah satu ujung sel polar. Tans-Kersten *et al.* (2001) menyatakan bahwa flagela pada bakteri berfungsi untuk bergerak cepat ke arah rangsangan inang, dan kecepatan tersebut sangat menentukan virulensi atau keganasan bakteri pada tahap awal infeksi dan kolonisasinya pada inang. Menurut Anitha *et al.* (2003) isolat virulen pada umumnya tidak memiliki flagel dan tidak mampu bergerak (non-mobile). Pada isolat avirulen atau tidak ganas, bakteri mampu bergerak dengan menggunakan 1–4 buah flagel polar. Virulensi *R. solanacearum* ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam menghasilkan eksopolisakarida. Eksopolisakarida merupakan senyawa dengan berat molekul tinggi yang dikeluarkan oleh bakteri *R. solanacearum* selama proses infeksi pada tanaman inang (Huang dan Allen, 2000).

Berdasarkan dari karakteristik koloninya pada media biakan TZC, bakteri *R. solanacearum* koloni berwarna merah muda dengan pusat berwarna merah (Chaudhry dan Rashid, 2011). Menurut French *et al.* (1995) dalam Chaudhry dan Rashid, (2011) bahwa isolat *R. solanacearum* yang virulen dapat ditentukan berdasarkan warna koloninya pada media khusus. Bakteri yang virulen, koloninya lebar, tinggi, cair, berwarna putih dengan pusat merah pucat. Sedangkan yang tidak virulen, koloni berkapur dengan pusat merah dan pinggir warna kebiruan.



Gambar 4. Koloni *R. solanacearum* pada media TZC (Chaudhry dan Rashid, 2011)

Di lapang patogen ini dapat menyebar melalui irigasi, air pada rerumputan, tanah yang penuh dengan gulma, bahan tanam yang terkontaminasi, alat pertanian yang terkontaminasi. Setelah ditanaman di lahan, patogen dapat berpindah dari akar tanaman yang terserang ke akar tanaman yang sehat. Serangan pada tanaman tomat akan menunjukkan gejala, yaitu layu eksternal berupa perubahan warna daun, setelah itu akan diikuti dengan gejala lain yaitu tangkai daun meunduk dan seluruh tanaman layu yang bersifat permanen (Anitha *et al.*, 2003).

Bakteri *R. solanacearum* hidup secara aerobik atau membutuhkan oksigen, dan sensitif terhadap kondisi kering. Mampu tumbuh pada suhu 25°C hingga 35°C, bakteri tidak akan mampu tumbuh pada suhu yang tinggi (41°C) (Anitha *et al.*, 2003). Menurut Hidayah dan Djajadi (2009) pada kondisi lingkungan dengan kadar air rendah (kering), pH tinggi (alkalin), suhu rendah dan tingkat kesuburan yang rendah bakteri *R. solanacearum* akan sangat sensitif. Bakteri ini diklasifikasikan menjadi 5 ras berdasarkan kisaran inang, ras 1 menyerang tembakau, tomat, dan Solanaceae lainnya; ras 2 menyerang tanaman pisang dan Heliconia; ras 3 menyerang tanaman kentang; ras 4 menyerang tanaman jahe, dan ras 5 menyerang murbei (Nasrun *et al.*, 2007). Berdasarkan oksidasi disakarida dan alkohol heksosa, bakteri ini dibagi dalam 5 biovar (Schaad *et al.*, 2001).

2.3. Bakteri Antagonis Tanaman

Pengendalian merupakan salah satu jalan untuk menurunkan intensitas serangan patogen, dan intensitas kerugian yang diderita petani. Pengendalian yang sekarang banyak dilakukan petani di Indonesia adalah secara kimia yaitu menggunakan insektisida, fungisida. Namun pengendalian secara kimia dapat membahayakan lingkungan, dan meninggalkan residu. Pengendalian menggunakan pestisida telah menimbulkan kekhawatiran serius terhadap keamanan pangan bagi masyarakat, memberi dampak yang buruk bagi lingkungan serta menyebabkan ketahanan tanaman terhadap pestisida. Dalam upaya menurunkan penggunaan pestisida yang berlebih, telah banyak dilakukan penelitian dan pengenalan pengendalian patogen tanaman menggunakan agen hayati. Penggunaan agen hayati dalam praktek budidaya tanaman, tidak menimbulkan efek negatif terhadap lingkungan seperti penggunaan pestisida. Pengendalian yang ramah lingkungan, dapat dilakukan dengan mikroba antagonis.

Bakteri antagonis dilaporkan dapat menekan patogen pada tumbuhan secara alamiah. Sejumlah mikroorganisme telah dilaporkan dalam berbagai penelitian ternyata efektif sebagai agen pengendalian hayati hama dan penyakit tumbuhan, diantaranya adalah dari genus-genus *Bacillus*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, dan *Verticilum* (Hasanuddin, 2003). Beberapa bakteri telah dilaporkan mampu dalam berperan sebagai agen antagonis patogen tanaman, yaitu kelompok *Bacillus* dan *Pseudomonas*. Bakteri antagonis biasanya mengeluarkan zat antibiotik yang dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan suatu jenis patogen (Wardhika *et al.*, 2014)

Mikroba antagonis bermanfaat sebagai agens pengendali patogen melalui mekanisme kompetisi, antibiosis, parasitisme atau ketahanan tereduksi. Mekanisme bakteri antagonis dalam mengendalikan patogen tanaman menurut Sharma *et al.* (2013) adalah sebagai berikut : **1. Kompetisi.** Mikroorganisme bertahan hidup di habitat alami mereka dengan cara bersaing ruang, mineral dan nutrisi untuk berkembang biak. Mekanisme kompetisi telah memainkan peran penting dalam biokontrol spesies *Fusarium* dan *Phytlum* oleh beberapa strain *Pseudomonas*. **2. Antibiosis.** Antibiosis merupakan proses antagonis mengeluarkan senyawa metabolit, agen litik, senyawa racun, dan antibiotik dalam mengendalikan patogen. Antibiosis memainkan peran penting dalam kontrol biologi. **3. Parasitisme.** Parasitisme terjadi ketika antagonis menyerang patogen dengan mengeluarkan enzim kitinase, selulosa, dan enzim litik lainnya.

2.4. Bahan organik

Bahan organik merupakan sisa-sisa tumbuhan atau hewan, yang dapat mempengaruhi sifat fisik, kimia, dan biologi tanah (Hakim *et al.*, 1986). Bahan organik yang berasal dari hewan yaitu dapat berupa pupuk kandang atau kompos. Pupuk kandang yaitu berasal dari hasil pembusukan kotoran hewan, baik itu berbentuk padat maupun cair sehingga warna, tekstur, bau dan kadar airnya tidak lagi seperti aslinya. Kompos umumnya tidak murni seratus persen dari kotoran hewan, namun terdapat campuran sisa makanan dan alas tidur hewan tersebut yang biasanya juga berasal dari tumbuhan.

Bahan organik memiliki peran penting bagi tanaman sebagai nutrisi, dan mengandung sejumlah mikroba seperti bakteri, jamur, kapang. Mikroba ini membantu dalam memecah residu organik menjadi bagian yang lebih sederhana selama proses pengomposan terjadi (Kuswinanti *et al.*, 2014). Bahan organik didalam tanah digunakan mikroorganisme sebagai sumber energi untuk

metabolisme (Astiko *et al.*, 2013). Bahan organik mampu meningkatkan jumlah mikroba dalam tanah, termasuk yang berpotensi sebagai agen hayati pengendali patogen tanaman (Kuswinanti *et al.*, 2014).

Berdasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Kuswinanti *et al.* (2014) ditemukan beberapa genus bakteri dari kompos kerbau yang mampu menghambat *R. solanacearum* yaitu *Coryneform*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pantoea*.



III. METODOLOGI

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan bulan Agustus 2018 di Laboratorium Penyakit Tumbuhan jurusan HPT Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. Sampel kompos sapi didapat dari peternakan sapi daerah di Dau, Kabupaten Malang.

3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, kompor, *Laminar Air Flow Cabinete* (L AFC), *autoclave*, cawan petri, jarum ose, tabung reaksi, bunsen, botol media, *cover glass*, *object glass*, pipet tetes, *micro pipet*, gelas ukur 100 ml, gelas ukur 10 ml, spatula, mortal, pistil, erlenmeyer ukuran 250 ml, stik L, korek api, mikroskop.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel kompos sapi, *plastic wrap*, alumunium foil, kapas, *bluetip*, aquades steril, media *Nutrient Agar* (NA), tisu steril, KOH 3%, alkohol 70%, alkohol 96%, kristal violet, iodine, safranin, NaCl, pepton, KH_2PO_4 , *bromotymol blue* 1%, H_2O_2 3%, *water agar*, kertas label, plastik, spirtus, kertas saring.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan cara pengambilan kompos sapi untuk diisolasi mendapatkan bakteri, purifikasi, seleksi bakteri antagonis, uji hipersensitif, identifikasi bakteri antagonis yang didapat, kemudian pengujian antagonis terhadap patogen *R. solanacearum*.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Pengambilan Kompos Sapi

Sampel kompos yang akan digunakan untuk isolasi bakteri diambil dari kompos sapi yang berasal dari peternakan sapi di daerah Dau, Kabupaten Malang. Pengambilan dilakukan secara random di beberapa area kecil. Kompos sapi yang dipakai yaitu, kotoran sapi yang telah terdekomposisi secara alami bersamaan dengan sisa makanan sapi yang berasal dari tumbuhan.

3.4.2. Pembuatan Media Tumbuh Bakteri

Media untuk menumbuhkan bakteri yang digunakan adalah media NA (*Nutrient Agar*). Untuk membuat 1000 ml media, membutuhkan 20 gram NA.

Cara pembuatannya yaitu NA yang dibutuhkan dilarutkan kedalam aquades, kemudian panasi sampai media benar-benar larut. Setelah itu media dimasukkan kedalam botol media lalu disterilkan menggunakan autoclave sampai suhu 121°C. Media yang telah siap diautoclave, kemudian dituang kedalam masing-masing cawan petri yang sebelumnya telah steril.

3.4.3. Isolasi

Sebanyak 1 gr kompos sapi dimasukkan kedalam aquades steril sebanyak 9 ml lalu dihomogenkan. Setelah itu sebanyak 1 ml larutan sampel diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml, dilakukan pengenceran pertama. Pengenceran pertama dihomogenisasi kemudian diambil 1 ml kultur dan dimasukkan ke dalam 9 ml dihitung sebagai pengenceran kedua. Dilakukan begitu seterusnya hingga pengenceran ke 8. Pengenceran digunakan karena untuk menumbuhkan koloni bakteri pada media yang terbatas tidak mungkin dilakukan penghitungan bakteri yang berjumlah puluhan ribu. Inokulasi dilakukan dengan teknik *spread plate*. Ambil 0,1 ml hasil pengenceran, dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah ada media padat didalamnya. Tutup cawan dengan rapat agar tidak kontaminasi. Selanjutnya diinkubasi selama 24-48 jam sampai terbentuk koloni. Setelah 24-48 jam masa inkubasi akan terbentuk koloni campuran. Koloni campuran yang tumbuh selanjutnya diamati dan dilakukan purifikasi.

3.4.4. Purifikasi

Koloni yang memiliki karakteristik morfologi yang berbeda selanjutnya dimurnikan dengan cara *streak plate*. Bakteri dimurnikan pada media *Nutrient Agar*. Sampel yang berada dalam cawan kemudian diinkubasi selama 24-48 jam untuk mendapat koloni tunggal. Isolat murni yang sudah didapat selanjutnya di simpan pada media cair sebagai stock murni.

3.4.5. Seleksi Bakteri Antagonis

Isolat murni yang telah didapat dari isolasi sebelumnya, kemudian dilakukan seleksi untuk mendapat bakteri yang berpotensi menjadi antagonis patogen *R. solanacearum*. Seleksi dilakukan dengan cara berdasarkan Kawaguchi *et al.* (2008) dalam Kusuma *et al.* (2016), yaitu pertama membuat suspensi untuk bakteri yang akan diseleksi sebagai antagonis. Pembuatan suspensi yaitu 2 ose isolat murni dicampur dengan 1 ml aquades kemudian

dihomogenkan. Kertas saring kemudian dicelupkan kedalam suspensi, setelah itu keringkan kertas saring kurang lebih 4 jam. Setelah kering kertas saring ditanam pada media NA, inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam. kemudian aplikasikan bakteri patogen dengan teknik semprot yang sebelumnya telah dibuat suspensi. Semprotkan secara merata pada media.

3.4.6. Uji Hipersensitif

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah isolat bakteri yang ditemukan merupakan bakteri patogen tanaman atau bukan. Suspensi bakteri diinfiltrasikan pada bagian permukaan daun tembakau menggunakan suntikan. Infiltrasikan aquades sebagai kontrol, untuk perbandingan dengan yang diinfiltrasi bakteri. Amati gejala yang muncul pada bagian daun yang diinfiltrasi bakteri. Bandingkan dengan perlakuan kontrol, apabila kondisi daun tetap sama seperti kontrol, tidak menunjukkan gejala nekrosis berarti bukan merupakan bakteri patogen tanaman. Namun jika terjadi nekrosis pada bagian yang infiltrasi berarti bakteri tersebut merupakan bakteri patogen tanaman.

3.4.7. Identifikasi

Karakterisasi bakteri antagonis meliputi karakteristik morfologi, fisiologi dan biokimia. Identifikasi didasarkan pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001). Pengujian fisiologi dan biokimia bakteri antagagonis, berupa uji gram, pewarnaan gram, uji Oksidatif-fermentatif, uji katalase, media YDC.

a. Uji Gram

- Pewarnaan Gram

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dengan jarum ose dan diletakkan pada gelas objek yang telah disterilkan dan dikeringkan diatas bunsen. Isolat ditetesi dengan larutan Kristal violet 5% secukupnya diamkan selama 1 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan iodine dan didiamkan selama 20 detik yang selanjutnya dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Kemudian tetesi dengan alkohol 70% tunggu sekitar 20 detik lalu bilas dengan air mengalir. Tahap terakhir yakni isolat ditetesi dengan larutan safranin 0,1% dan didiamkan selama 20 detik kemudian dibilas dengan air mengalir dan keringkan. Diamati morfologi sel, serta warnanya di bawah mikroskop. Bakteri dengan gram positif akan menunjukkan warna ungu, sedangkan bakteri negatif akan berwarna merah.

- KOH

Pengujian gram dengan menggunakan KOH 3% digunakan untuk menentukan sifat gram positif maupun gram negatif dari bakteri berdasarkan pembentukan lendir dari isolat bakteri yang direaksikan dengan KOH 3%. Isolat bakteri yang akan diuji diletakkan pada gelas objek yang telah ditetesi KOH 3%. Kemudian suspensi bakteri ditarik-tarik menggunakan jarum ose secara cepat dan berkali-kali. Pada bakteri negatif akan tampak lendir pada saat diangkat, sedangkan pada bakteri positif akan tetap encer atau tidak menunjukkan reaksi.

b. Uji Oksidatif-Fermentatif

Uji OF dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan isolat bakteri apakah bersifat oksidatif atau fermentatif. Bahan yang dibutuhkan untuk membuat 1 lt media uji OF yaitu : pepton 2 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 0,3 g; agar 3,0 g dan *bromotymol blue* 1% 3,0 ml. Bahan-bahan dilarutkan diukur sampai pH 7,1 kemudian media dituang kedalam tabung reaksi sebanyak 4,5 ml per tabung. Media disterilisasi pada suhu 121°C. Setelah steril, setiap tabung ditambah larutan glukosa 10% sebanyak 0,5 ml. Inokulasi bakteri dengan cara menusukkan bakteri dengan jarum ose pada media. Inokulasi dilakukan pada dua tabung, tabung pertama ditambahkan water agar 1 ml sebagai penutup (kondisi anaerob), tabung kedua dibiarkan tanpa water agar (kondisi aerob). Inkubasi dan pengamatan pada perubahan warna yang terjadi. Media pada tabung tanpa water agar steril berubah warna dari biru menjadi kuning dan tabung lainnya tetap biru berarti bakteri bersifat oksidatif. Media pada kedua tabung berubah warna dari biru menjadi kuning berarti bakteri bersifat fermentatif. Media di kedua tabung tidak berubah berarti bakteri tidak memecah glukosa dalam medium.

c. Uji Pigmen Fluorescen pada Media King's B

Uji pigmen fluorescen dilakukan pada media King's B, tujuannya untuk melihat kemampuan bakteri menghasilkan pigmen fluorescent. Pengujian dilakukan dengan menggoreskan bakteri uji yang berumur 24 jam pada media King's B, setelah itu diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi bakteri yang tumbuh diamati pada sinar *ultra violet* (UV). Reaksi positif akan menampilkan isolat bakteri berpendar hijau, yang menunjukkan bakteri tersebut menghasilkan pigmen fluorescent.

d. Uji Pertumbuhan Koloni Kuning pada Media YDC

Pengujian pertumbuhan koloni kuning pada media YDC bertujuan untuk melihat koloni bakteri, termasuk dalam genus *Pantoea* atau *Erwinia*. Media YDC terdiri dari Yeast-extract 10 g, glukosa 20 g, CaCO_3 20 g dan agar 15g, semua bahan dicampur dan dilarutkan dengan aquades 1 L. Media kemudian disterilisasi pada suhu 121°C . Bakteri uji yang berumur 24 jam kemudian digoreskan pada media YDC lalu diinkubasi 24-48 jam. Diamati warna koloni yang tumbuh, reaksi positif koloni berwarna kuning yang menunjukkan bakteri genus *Pantoea*, sedangkan apabila koloni putih merupakan genus *Erwinia*.

Pengujian ini juga dilakukan, setelah pengujian pigmen fluorescent yang hasilnya negatif. Apabila hasilnya positif yaitu koloni bakteri berwarna kuning dapat digolongkan genus *Xanthomonas* atau *Xylophilus*, yang nantinya dilakukan uji selanjutnya untuk membuktikan genus dari salah satu bakteri tersebut

e. Uji pada Media YDC suhu 33°C

Bakteri ditumuhkan pada media YDC dengan suhu 33°C , tujuannya untuk menentukan bakteri pada genus *Xylophilus* atau *Xanthomonas*. Bakteri uji berumur 24 jam ditumbuhkan pada media YDC, lalu diinkubasi pada suhu 33°C . reaksi positif yaitu, pada media akan tumbuh koloni bakteri. Apabila negatif bakteri tidak tumbuh pada media. Reaksi positif yaitu genus bakteri *Xanthomonas*, reaksi negatif genus *Xylophilus*.

f. Uji Katalase

Uji Katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Uji Katalase dilakukan dengan meletakkan satu ose koloni bakteri pada *object glass*. Kemudian bakteri ditetesi dengan H_2O_2 3%. Koloni positif menghasilkan enzim katalase jika dihasilkan gelembung.

3.4.6. Uji Antagonis Secara *In Vitro*

a. Perbanyakkan Bakteri Patogen *Ralstonia solanacearum*

Bakteri patogen yang akan digunakan dalam uji hambat bakteri antagonis yaitu *R. solanacearum*, yaitu yang menyebabkan layu bakteri pada tanaman Tomat. Isolat didapatkan dari koleksi Laboratorium Penyakit Tumbuhan 1 Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Bakteri diperbanyak pada media NA, untuk mendapatkan isolat baru yang akan digunakan pada penelitian. Isolat bakteri disimpan pada media cair. Perbanyakkan dilakukan yaitu dengan menggunakan ose kemudian digoreskan pada media NA sampai muncul koloni

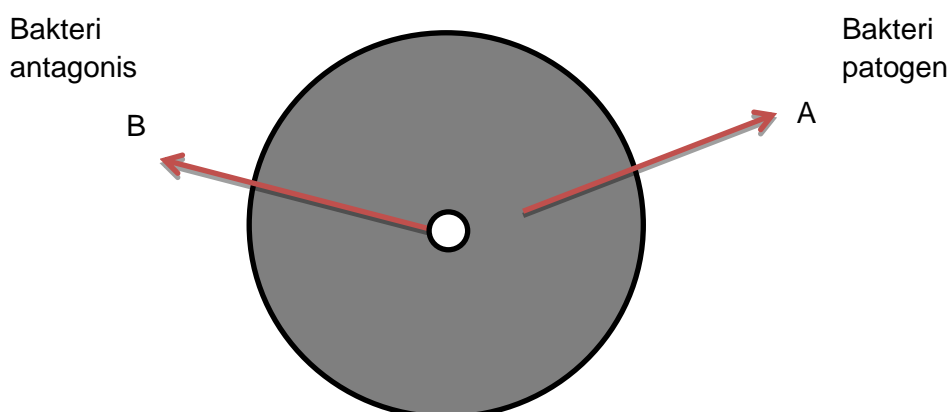
tunggal. Isolat *R. solanacearum* ditumbuhkan pada media TZC untuk melihat virulensi dari bakteri tersebut, dan mengidentifikasi bakteri *R. solanacearum*.

b. Uji Antagonis Secara *In vitro*

Uji antagonis secara *in vitro* menggunakan metode pengkabutan Kawaguchi *et al.* (2008) dalam Kusuma *et al.* (2016). Pengujian antagonis menggunakan bakteri yang terseleksi memiliki kemampuan antagonis, pada media NA di cawan petri dengan diameter 9 cm. Langkah yang dilakukan pada uji antagonis yaitu, bakteri terseleksi antagonis dibuat suspensi. Bakteri yang digunakan yaitu berumur 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri yaitu, 2 ose bakteri dihomogenkan dengan 1 ml aquades. Kertas saring berukuran 0,5 cm direndam dalam suspensi selama kurang lebih 3 detik, lalu ditiriskan selama 4 jam. Setelah 4 jam kertas saring diletakkan pada media NA dengan posisi dibagian tengah media, 1 kertas saring pada 1 media. Inkubasi bakteri antagonis selama 24 jam, setelah itu aplikasikan bakteri patogen yang telah dibuat suspensi sebelumnya dengan cara menyemprotkan pada media yang telah ada bakteri antagonis. Semprotkan sampai 3 kali semprotan, atau sampai merata pada media. Kemudian inkubasi selama 24-48 jam, sampai terlihat penghambatan bakteri antagonis terhadap bakteri patogen. Menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan 4 perlakuan yaitu 3 bakteri antagonis yang ditemukan, dengan 1 kontrol yaitu menggunakan aquades. Kontrol berfungsi untuk mengetahui apakah aquades mempunyai efek terhadap patogen. Masing-masing perlakuan tersebut diulang sebanyak 6 kali. 4 perlakuan tersebut pada tabel 1.

Tabel 1. Perlakuan uji antagonis

Kode	Perlakuan
P0	Kontrol dengan aquades
P1	Antagonis bakteri a terhadap <i>R. solanacearum</i>
P2	Antagonis bakteri b terhadap <i>R. solanacearum</i>
P3	Antagonis bakteri c terhadap <i>R. solanacearum</i>



Gambar 5. Uji antagonis terhadap *R. solanacearum*

3.5. Variabel pengamatan

Variabel yang akan diamati dalam penelitian ini meliputi

1. Karakteristik Bakteri Antagonis dari Kompos Sapi

Karakteristik bakteri antagonis yang ditemukan, diidentifikasi berdasarkan uji identifikasi bakteri *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001).

2. Tingkat hambatan pada uji antagonis

Pengamatan dilakukan dengan mengamati rata-rata zona hambat atau zona bening dari bakteri antagonis terhadap *R. solanacearum* dan mengukur zona hambat tersebut. Selanjutnya dilakukan dokumentasi pada zona bening yang ditimbulkan. Perhitungan daya hambat dihitung menggunakan rumus menurut Pratiwi (2005) :

$$\text{Diameter daya hambat} = \frac{Dv + Dh}{2}$$

Keterangan :

Dv : Diameter vertikal (cm)

Dh : Diameter horizontal (cm)

Kemudian dilanjutkan mengukur rata-rata indeks penghambatan dengan rumus :

$$IP : \frac{DH - 0,5}{DH}$$

Keterangan :

IP : Indeks penghambatan

DH : Diameter daya hambat (cm)

0,5 : Diameter kertas saring yang berisi agens hayati

3.5. Analisis Data

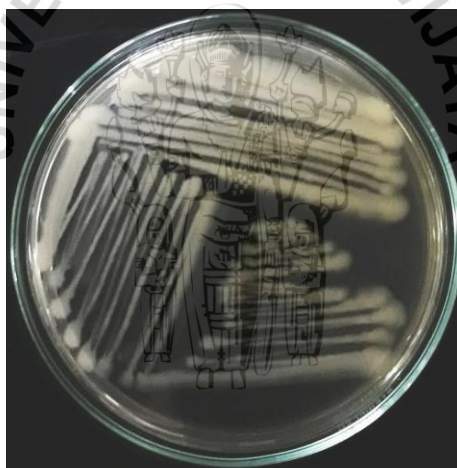
Semua data hasil pengamatan dianalisis menggunakan Analysis of Variance (ANOVA). Analisis ragam menggunakan software DSAASTAT Adins Excel 2010. Untuk mengetahui perbedaan di antara perlakuan, maka dilakukan uji BNT pada taraf nyata 5%



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Identifikasi dan Pemurnian *Ralstonia solanacearum*

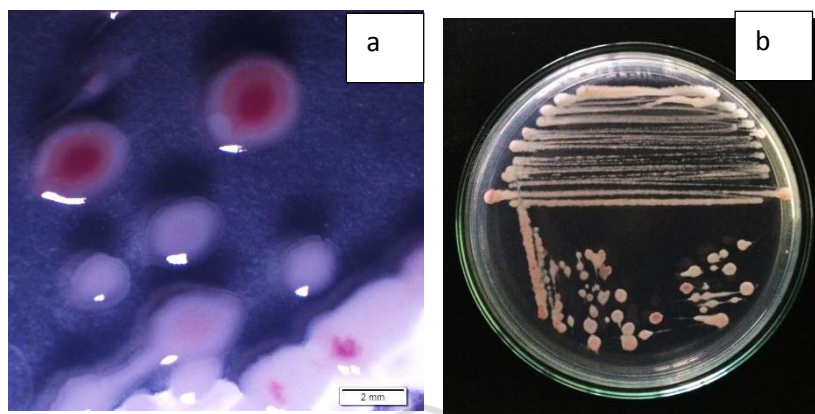
Patogen yang digunakan dalam uji antagonis adalah *R. solanacearum*, yaitu patogen yang menyebabkan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat. Isolat bakteri yang digunakan yaitu berasal dari koleksi laboratorium Penyakit Tumbuhan Jurusan HPT. Sebelum digunakan, terlebih dahulu dilakukan perbanyakan isolat bakteri. Perbanyakan bakteri dari media cair, dilakukan dengan cara menggoreskan isolat pada media NA menggunakan ose kemudian diinkubasi 24-48 jam sampai muncul koloni. Bakteri *R. solanacearum* yang ditumbuhkan pada media NA mempunyai koloni berwarna putih, berlendir, dengan bentuk tidak teratur. Berdasarkan penelitian Nasrun *et al.* (2007) morfologi bakteri *R. solanacearum* hasil isolasi yaitu berwarna putih, fluidal, berbentuk tidak teratur. Morfologi *R. solanacearum* pada media NA dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Koloni *R. solanacearum* umur 24 jam pada media NA

Bakteri *R. solanacearum* yang digunakan untuk uji antagonis dilakukan pengujian virulensi dan identifikasi untuk menunjukkan bahwa isolat merupakan bakteri *R. solanacearum*, yaitu dengan ditumbuhkan pada media TZC. Isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media TZC, akan muncul koloni yang berlendir berwarna merah muda pada bagian tengah koloni namun tepinya berwarna putih. Menurut French *et al.* (1995) dalam Chaudhry dan Rashid, (2011) bahwa isolat *R. solanacearum* yang virulen dapat ditentukan berdasarkan warna koloninya pada media TZC. Bakteri yang virulen, koloninya lebar, cembung, cair, berwarna putih dengan pusat merah pucat. Sedangkan bakteri yang tidak virulen,

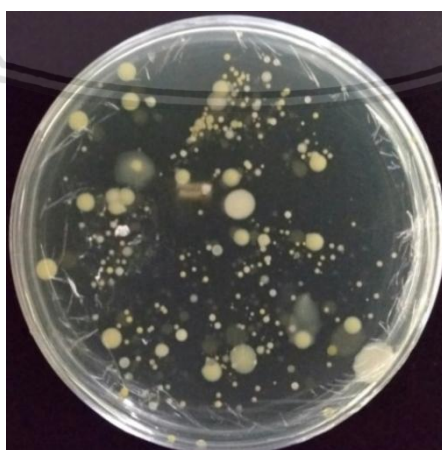
koloni berkapur dengan pusat berwarna merah dan pinggir warna kebiruan. Koloni *R. solanacearum* pada media TZC dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Koloni *Ralstonia* pada media TZC, a) Koloni dilihat menggunakan mikroskop, c) Koloni pada cawan petri

4.2. Eksplorasi Bakteri Antagonis dari Kompos Sapi

Kompos sapi diperoleh dari salah satu peternakan sapi yang ada di Kecamatan Dau, Kabupaten Malang. Isolasi bakteri menggunakan metode pengenceran bertingkat sampai pengenceran ke 8. Isolasi dilakukan menggunakan metode *spread plate* diatas media NA padat, yaitu menuangkan 0,1 ml suspensi lalu diratakan dengan stik L. Hasil pengenceran diperoleh sebanyak 20 bakteri, dari 20 bakteri yang telah diperoleh kemudian dimurnikan dimedia NA untuk mendapat kultur murni dari masing-masing bakteri hasil isolasi. Hasil pemurnian bakteri tiap koloni yang berbeda nantinya akan dilakukan seleksi uji antagonis, untuk melihat potensi antagonis tiap isolat bakteri tersebut. Hasil pengenceran bakteri dari kompos sapi dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Bakteri hasil pengenceran tingkat 8 pada media NA

Kompos/bahan organik memiliki peran penting bagi tanaman sebagai nutrisi dan kebutuhan hara, dan mengandung sejumlah mikroba seperti bakteri,

jamur, kapang. Mikroba ini membantu dalam memecah residu organik menjadi bagian yang lebih sederhana selama proses pengomposan terjadi (Kuswinanti *et al.*, 2014). Membantu meningkatkan jumlah mikroba dalam tanah, termasuk yang berpotensi sebagai agen hayati pengendali patogen tanaman (Kuswinanti *et al.*, 2014).

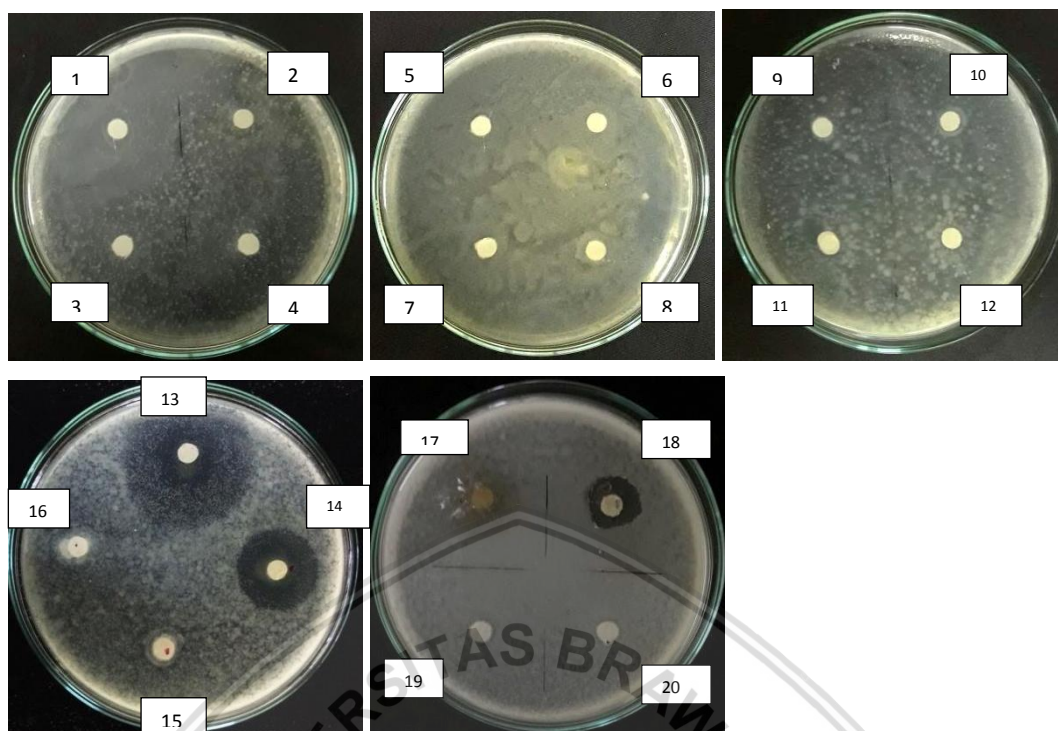
4.3. Seleksi Bakteri yang Berpotensi Antagonis terhadap *Ralstonia solanacearum*

Dari hasil eksplorasi bakteri dari kompos sapi telah didapat 20 isolat bakteri, namun belum diketahui kemampuan antagonis dari semua isolat tersebut. Untuk mengetahui bakteri yang mampu menjadi agen antagonis, maka perlu dilakukannya seleksi antagonis dengan patogen *R. solanacearum*. Dari seleksi akan diketahui kemampuan antagonis dari masing-masing bakteri. Hasil seleksi bakteri yang mampu menjadi antagonis dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Bakteri hasil seleksi antagonis

Kode Isolat	Ukuran zona bening (cm)	Kode isolat	Ukuran zona bening (cm)
S1	0	S11	0
S2	0	S12	0
S3	0	S13	0,868
S4	0	S14	0,750
S5	0	S15	0
S6	0	S16	0
S7	0	S17	0
S8	0	S18	0,642
S9	0	S19	0
S10	0	S20	0

Setelah dilakukan seleksi dari semua isolat bakteri, amati bakteri mana yang mampu menjadi agen antagonis. Daya antagonis dapat dilihat dengan munculnya zona bening yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Isolat yang menghasilkan senyawa penghambatan ditandai dengan munculnya zona bening disekitar koloni bakteri antagonis (Saputra *et al.*, 2015). Munculnya zona hambat ini mengindikasikan adanya mekanisme antibiosis dari 3 isolat bakteri tersebut (Saputra *et al.*, 2015). Bakteri terseleksi antagonis dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Pertumbuhan tiap-tiap bakteri hasil eksplorasi pada media NA yang ditumbuhi patogen *R. solanacearum*

Semua isolat bakteri yang telah dilakukan seleksi, diperoleh 3 isolat yang mampu menghambat bakteri *R. solanacearum* secara *In vitro*. Isolat yang mampu menghambat bakteri *R. solanacearum* yaitu isolat dengan kode S13, S14, dan S18. Ketiga bakteri tersebut mampu menghambat patogen dengan membentuk zona bening disekitar koloni, 3 isolat tersebut memiliki daya hambat yang berbeda-beda. Bakteri lainnya yang tidak menghasilkan zona hambat saat pengujian antagonis, berarti bukan merupakan bakteri yang berpotensi sebagai antagonis bakteri *R. solanacearum*.

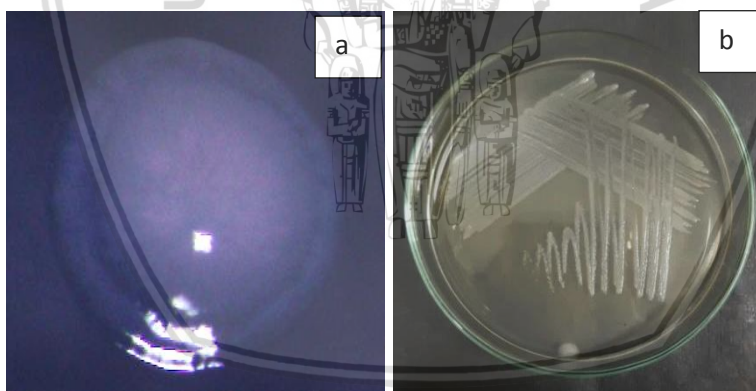
4.4. Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Terseleksi

Berdasarkan uji efektifitas telah diperoleh 3 isolat bakteri yang mampu menghambat patogen *R. solanacearum* pada cawan petri. Untuk mengetahui karakteristik masing-masing isolat dilakukan pengamatan morfologi, fisiologi dan biokimia berdasarkan Bergey's *Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001) untuk mengidentifikasi genus bakteri yang ditemukan.

4.4.1. Karakterisasi Morfologi

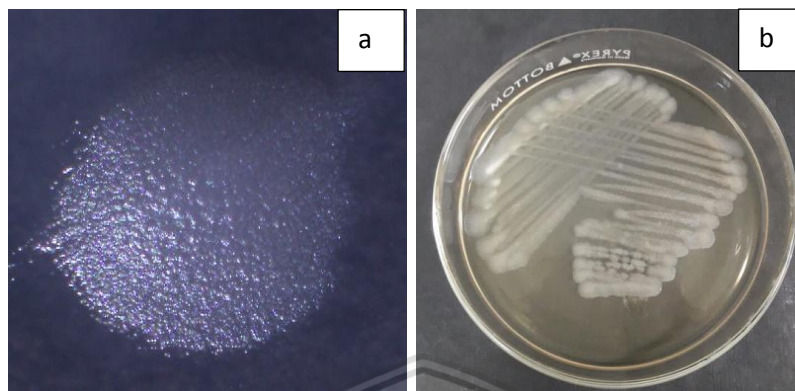
Karakteristik morfologi bakteri diamati koloni tunggal yang dibiakkan pada media NA di cawan petri. Isolat bakteri yang diamati yaitu biakan umur 24-48 jam. Dari hasil pengamatan morfologi 3 bakteri uji yang berpotensi sebagai antagonis patogen *R. solanacearum*. Dapat diamati karakteristik morfologinya, untuk lebih jelas koloni bakteri dilihat dengan mikroskop sehingga lebih mudah dalam mengidentifikasinya.

Secara morfologi dapat dijelaskan, pada isolat kode S13 memiliki bentuk koloni bulat, permukaan cembung, warna koloni krem, dan tepi rata. Koloni bakteri S13 dapat dilihat pada gambar 10.



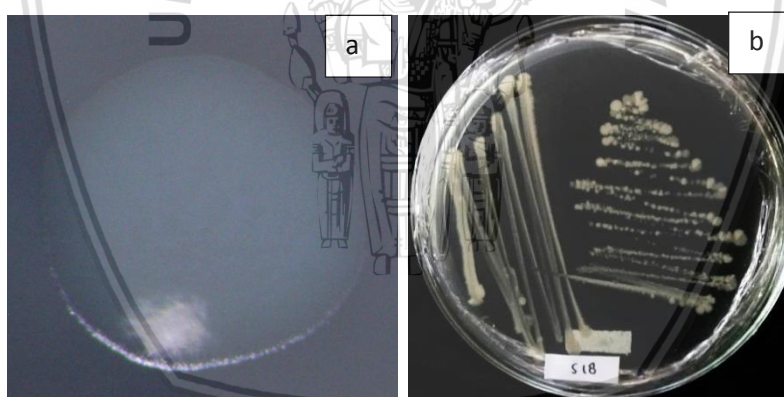
Gambar 10. Kenampakan koloni bakteri S13, a) Koloni bakteri diamati dengan mikroskop, b) Koloni pada cawan petri

Isolat bakteri kode S14 memiliki bentuk koloni yaitu bulat, permukaannya cembung, warna koloni yaitu putih krem, dengan tepi tidak rata. Koloni bakteri S14 dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Kenampakan koloni bakteri S14 a) Koloni dilihat dengan mikroskop
b) Koloni pada cawan petri

Pada isolat kode S18 memiliki bentuk koloni bulat, permukaan cembung, warna koloni putih, dan tepi rata. Jika dilihat pada mikroskop setiap isolat memiliki karakteristik koloni masing-masing berbeda. Koloni bakteri S18 dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Kenampakan koloni bakteri S18 a) Koloni dilihat dengan mikroskop
b) Koloni pada cawan petri

Hasil karakterisasi bakteri terseleksi yang mampu menghambat patogen *R. solanacearum* secara morfologi dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik morfologi bakteri antagonis

Isolat	Karakter morfologi			
	Bentuk	Permukaan	Warna	Tepi
S13	Bulat	Cembung	Krem	Rata
S18	Bulat	Cembung	Putih	Rata
S14	Bulat	Cembung	Putih krem	Tidak rata

4.4.2. Karakterisasi Fisiologi dan Biokimia

Karakterisasi fisiologi dan biokimia dilakukan beberapa uji, yaitu uji hipersensitif, reaksi gram, uji oksidatif-fermentatif, koloni kuning pada media YDC, pengujian fluourescent pada kings B, pertumbuhan pada 33°C di YDC, uji katalase. Identifikasi didasarkan pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt *et al.*, 1994) dan Schaad *et al.* (2001).

1. Uji Hipersensitif

Pengujian hipersensitif yaitu dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang diuji termasuk bakteri patogen atau non patogen pada tanaman (Fanani *et al.*, 2015). Dari uji yang telah dilakukan pada 3 bakteri, menunjukkan bakteri tersebut bukan merupakan bakteri patogen tanaman. Uji hipersensitif pada daun tembakau dapat dilihat pada gambar 13.

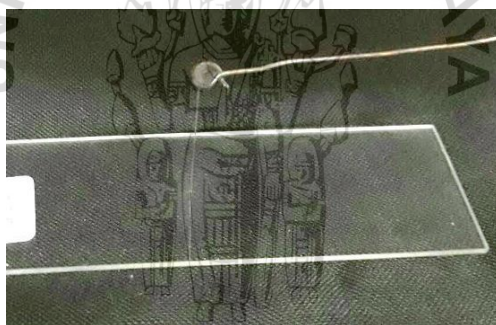


Gambar 13. Uji hipersensitif pada daun tembakau, a) Isolat S18 tidak ada gejala nekrosis, b) Kontrol

Dari pengujian dapat dilihat bahwa pada bagian daun yang diinfiltrasi dengan ketiga bakteri uji, tidak menunjukkan adanya gejala nekrosis dalam waktu 4 hari. Daun yang diinfiltrasikan bakteri tersebut, memiliki kenampakan sama dengan kontrol yaitu tidak muncul gejala nekrosis. Kontrol dilakukan dengan menginfiltrasikan aquades steril pada daun tembakau. Gejala hipersensitif terlihat jika pada bagian yang diinfiltrasi supensi bakteri terjadi nekrosis dalam waktu 1–4 hari (Klement, 1990 *dalam* Fanani *et al.*, 2015). Gejala nekrosis yaitu pada bagian daun yang diinfiltrasi bakteri muncul bercak kekuningan hingga coklat pada permukaan daun.

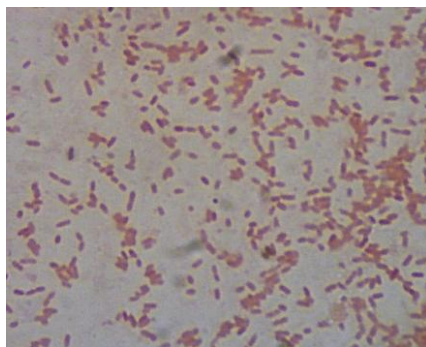
2. Uji Gram

Uji gram pada bakteri dilakukan untuk mengelompokkan bakteri kedalam gram negatif atau gram positif. Pengujian dilakukan dengan pengujian menggunakan larutan KOH dan pewarnaan gram. Pengujian pada larutan KOH 3%, dari 3 bakteri uji yaitu ketiga bakteri merupakan bakteri gram negatif. Dilihat dari 3 bakteri tersebut saat diuji menggunakan KOH, terbentuk lendir yang mana saat ose diangkat lendir akan ikut terangkat. Hal ini dikarenakan bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih sensitif dan tidak memiliki ketahanan terhadap penghambat basa, yaitu larutan KOH (Shivas dan Beasley, 2005). Apabila sel bakteri gram negatif direaksikan dengan KOH yang terjadi yaitu dinding sel akan pecah dan terjadi lisis, sehingga DNA dilepaskan. DNA pada air bersifat sangat kental, sehingga akan terbentuk lendir (Purwohadisantoso *et al.*, 2009). Berbeda dengan bakteri gram positif yang memiliki dinding sel yang lebih resistan terhadap KOH, sehingga dinding sel tidak pecah saat direaksikan dengan KOH (Purwohadisantoso *et al.*, 2009). Hasil pengujian gram menggunakan larutan KOH 3% dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 14. Hasil uji KOH gram negatif menghasilkan lendir

Pewarnaan gram merupakan bagian dari uji gram, 3 bakteri yang diuji setelah dilakukan pewarnaan dan diamati dengan mikroskop yaitu sel pada ketiganya berwarna merah. Menunjukkan jika 3 bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram negatif. Sel dari ketiga bakteri antagonis tersebut berbentuk basil. Bakteri gram negatif yaitu bakteri yang tidak mempertahankan warna ungu, saat pewarnaan. Berbeda dengan bakteri gram positif yang akan mempertahankan warna ungu dari pewarnaan kristal violet, walau setelah dibersihkan dengan alkohol (Nurdiansyah, 2008). Dimana bakteri gram negatif akan berwarna merah atau merah muda, yang berasal dari pewarnaan kedua yang gunanya untuk membedakan antara bakteri gram positif dan negatif. Sel bakteri dapat dilihat pada gambar 15.

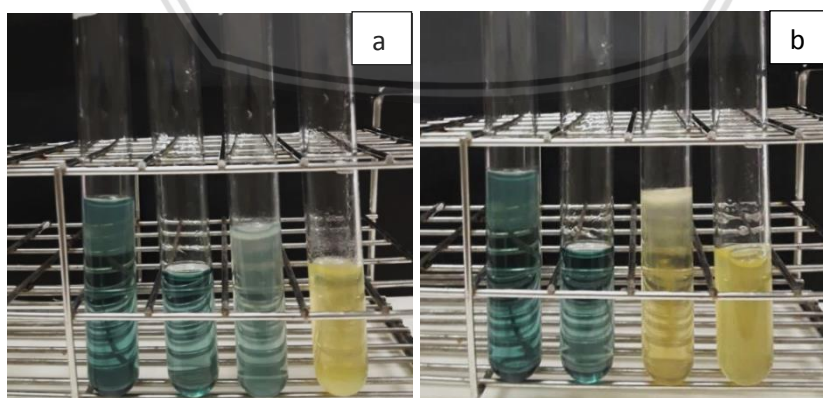


Gambar 15. Sel batang bakteri pada perbesaran 100x

Perbedaan dari struktur dinding sel bakteri gram negatif dan gram positif yang menyebabkan perbedaan reaksi pada pewarnaan. Dinding sel pada bakteri gram negatif mengandung lipida yang tinggi dibandingkan bakteri gram positif yang sebagian besar dinding selnya tersusun dari peptidoglikan. Lipida akan larut dalam alkohol yang digunakan, pori-pori dinding sel bakteri membesar dan akan meningkatkan daya larut kristal violet (warna ungu) pada dinding sel bakteri negatif (Hidayat dan Alhadi, 2012).

3. Uji Oksidatif-Fermentatif

Pada pengujian oksidatif-fermentatif, didapatkan hasil yaitu dari 3 isolat bakteri tersebut 1 bakteri bersifat fermentatif dan 2 bakteri bersifat oksidatif. Pada bakteri yang bersifat oksidatif terjadi perubahan warna dari biru ke kuning pada tabung yang tidak diberi water agar. Sedangkan pada bakteri yang bersifat fermentatif, kedua tabung yaitu diberi water agar maupun tidak diberi water agar keduanya berubah warna menjadi kuning. Hasil pengujian OF dapat dilihat pada gambar 16.



Gambar 16. Hasil uji Oksidatif-Fermentatif : a) Bakteri Oksidatif, b) Bakteri Fermentatif

Bakteri oksidatif membutuhkan oksigen dalam memfermentasi glukosa, sehingga hanya tabung yang tidak diberi water agar yang berubah warna. Berbeda dengan bakteri fermentatif yang tanpa oksigen mampu memfermentasi glukosa dan menghasilkan asam (Chatri, 2016). Bakteri oksidatif hanya bisa memetabolisme gula atau karbohidrat lainnya dalam kondisi aerob atau tersedia oksigen (Chaudhry dan Rashid, 2011). Organisme fermentatif akan menghasilkan reaksi asam pada tabung yang ditutup water agar maupun tidak, sedangkan organisme oksidatif hanya akan memproduksi reaksi asam pada tabung yang tidak ditutup water agar. Asam yang dihasilkan dari fermentasi akan menurunkan pH medium sehingga indikator BTB menjadi berwarna kuning (Chaudry dan Rashid, 2011).

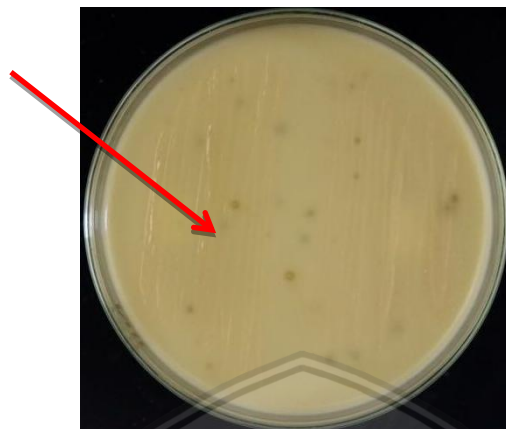
4. Uji Pigmen Fluorescent

Bakteri yang akan diuji pigmen fluorescent, ditumbuhkan pada media King's B lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi diamati dibawah sinar UV, namun tidak nampak ada pendar hijau menyala sehingga hasilnya negatif. Menurut Schaad *et al.* (2001), apabila terlihat ada pigmen fluorescent setelah bakteri ditumbuhkan pada media King's B menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk *Pseudomonas fluorescens*. Karena bakteri uji tidak berpendar, menurut bagan pada panduan Schaad bakteri tersebut dapat tergolong pada genus *Agrobacterium*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* atau *Xylophilus*. Maka untuk mengetahui genus dari bakteri tersebut, dilakukan uji selanjutnya yaitu uji koloni kuning pada media YDC.

5. Koloni kuning pada YDC

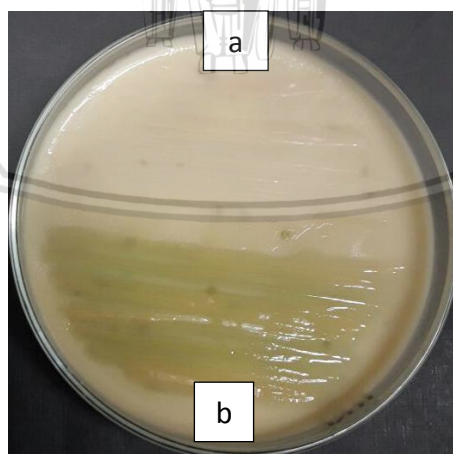
Uji pertumbuhan pada media YDC dilakukan untuk bakteri gram negatif, setelah uji oksidatif-fermentatif hasilnya positif yaitu isolat bakteri S14. Bakteri tersebut diuji pada media YDC. Menurut Schaad *et al.* (2011) YDC adalah media selektif untuk pertumbuhan bakteri genus *Pantoea* sp.. Pada pengujian di media YDC untuk mengetahui bakteri tersebut termasuk kedalam genus *Pantoea* atau *Erwinia*. Hasil pengujian pada media tumbuh koloni berwarna kuning, yang menunjukkan reaksi positif yaitu merupakan bakteri genus *Pantoea*. Jika koloni berwarna putih, menunjukkan bakteri merupakan genus *Erwinia*.

Dari hasil uji tersebut, menunjukkan bakteri kedalam genus *Pantoea* sp, karena menghasilkan koloni berwarna kuning. Hasil pengujian koloni kuning pada media YDC dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 17. Koloni bakteri *Pantoea* sp berwarna kuning pada media YDC

Pengujian pada media YDC dilakukan juga untuk isolat bakteri S13 dan S18. Pengujian ini dilakukan, setelah pengujian pigmen fluorescent yang hasilnya negatif. Apabila hasilnya positif yaitu koloni bakteri berwarna kuning dapat digolongkan genus *Xanthomonas* atau *Xylophilus*, yang nantinya dilakukan uji selanjutnya untuk membuktikan genus dari salah satu bakteri tersebut. Dari uji ini menunjukkan respon negatif pada isolat S18 yaitu koloni bakteri berwarna putih, positif pada isolat S13 koloni nampak berwarna kuning. Pengujian koloni kuning pada media YDC dapat dilihat pada gambar 18.



Gambar 18. Uji koloni kuning pada media YDC, a) Bakteri S18 menghasilkan koloni berwarna putih, b) Bakteri S13 menghasilkan koloni berwarna kuning

Bakteri S13 hasilnya positif yaitu koloni berwarna kuning, sehingga dilakukan uji selanjutnya yaitu pertumbuhan bakteri pada media YDC di suhu 33°C, untuk menentukan bakteri tersebut dalam genus *Xanthomonas* atau

Xylophilus. Bakteri S18 koloni berwarna putih termasuk golongan genus *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Ralstonia* yang harus dilakukan uji selanjutnya pada media DIM untuk membuktikan bakteri tersebut.

6. Uji pada Media YDC Suhu 33°C

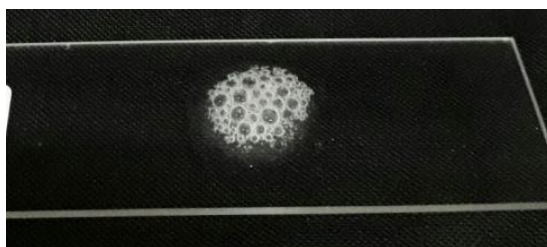
Pengujian ini merupakan lanjutan setelah uji koloni kuning pada media YDC yang hasilnya positif, untuk menentukan genus bakteri *Xylophilus* atau *Xanthomonas*. Dari pengujian yang telah dilakukan, menunjukkan hasil positif pada koloni S13 yaitu bakteri mampu tumbuh pada media YDC. Menurut Schaad *et al.* (2001) respon positif yaitu pada media YDC koloni dapat tumbuh. Sehingga bakteri termasuk dalam genus *Xanthomonas* sp.. Sehingga dari hasil pengujian ini bakteri S13 termasuk dalam genus *Xanthomonas* sp. Pertumbuhan bakteri *Xanthomonas* sp pada media YDC di suhu 33°C dapat dilihat pada gambar 19.



Gambar 19. Koloni bakteri *Xanthomonas* sp tumbuh pada suhu 33°C

7. Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya enzim katalase pada bakteri yang diuji. Setelah dilakukan pengujian katalase dari 3 bakteri antagonis menunjukkan reaksi positif setelah ditetesi larutan H₂O₂ 3%. Reaksi positif ditandai munculnya gelembung gas pada suspensi. Munculnya gelembung pada uji katalase dapat dilihat pada gambar 20.



Gambar 20. Uji katalase positif menghasilkan gelembung.

Bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 yang bersifat racun terhadap sel. Hidrogen peroksida terbentuk saat metabolisme aerob, sehingga bakteri harus menguraikan bahan toksik tersebut. Bakteri yang mampu memecah H_2O_2 dengan enzim katalase maka akan segera membentuk sistem pertahanan dari toksik H_2O_2 yang dihasilkannya sendiri. Bakteri yang memiliki enzim katalase akan memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , yang ditunjukkan dengan adanya gelembung-gelembung oksigen pada isolat, berbeda dengan bakteri katalase negatif yang tidak menghasilkan gelembung-gelembung berarti H_2O_2 yang diberikan tidak dipecah (Hidayat dan Alhadi, 2012). Semua bakteri gram negatif memproduksi gelembung udara, ketika dicampurkan dengan H_2O_2 pada gelas objek. Produksi gelembung udara menunjukkan bakteri tersebut aerob dan aerob fakultatif (Schaad, 1980). Hasil uji fisiologi dan biokimia bakteri dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Karakterisasi fisiologi dan biokimia

Karakterisasi	Isolat		
	S13	S18	S14
Uji hipersensitif	-	-	-
Uji KOH	-	-	-
Uji pewarnaan gram	-	-	-
Oksidatif fermentatif	-	-	+
Pigmen Fluorescen	-	-	TD
Koloni kuning pada YDC	+	-	+
Uji di media YDC suhu 33°C	+	TD	TD
Uji katalase	+	+	+

Keterangan : (-) reaksi negatif, (+) reaksi positif, (TD) tidak dilakukan

4.4.3 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri terseleksi setelah dilakukan uji karakterisasi morfologi, fisiologi dan biokimia, kemudian diidentifikasi menggunakan panduan identifikasi bakteri sesuai dengan karakteristik masing-masing bakteri. Berdasarkan dari karakteristiknya, masing-masing bakteri dikelompokkan dengan genus yang sesuai. 3 bakteri terseleksi setelah diidentifikasi, masing-masing masuk kedalam genus yang berbeda. Hasil identifikasi bakteri terseleksi dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. hasil identifikasi bakteri terseleksi

Karakterisasi	Isolat		
	S13	S18	S14
Uji hipersensitif	-	-	-
Uji KOH	-	-	-
Pewarnaan gram	-	-	-
Oksidatif fermentatif	-	-	+
Pigmen Fluorescen	-	-	TD
Koloni kuning pada YDC	+	-	+
Uji media YDC suhu 33°C	+	TD	TD
Uji katalase	+	+	+
Bentuk koloni	Bulat	Bulat	Bulat
Permukaan koloni	Cembung	Cembung	Cembung
Warna koloni	Krem	Putih	Putih krem
Tepi koloni	Rata	Rata	Tidak rata
Genus	<i>Xanthomonas</i> sp	-	<i>Pantoea</i> sp

Keterangan : (-) reaksi negatif, (+) reaksi positif, (TD) tidak dilakukan

Isolat S13, memiliki karakteristik morfologi koloni yaitu bentuk koloni bulat, permukaan cembung, warna krem, dan tepi koloni rata. Karakteristik fisiologi berdasarkan beberapa pengujian biokimia, hasil identifikasi menunjukkan uji gram negatif, pengamatan mikroskop sel berwarna merah dan bentuk sel batang, menghasilkan enzim katalase. Berdasarkan Schaad *et al.* (2001) bakteri dengan karakter tersebut tergolong genus *Xanthomonas* sp setelah dilakukan uji koloni kuning pada media YDC.

Isolat S18, memiliki karakteristik morfologi koloni yaitu bentuk koloni bulat, permukaan cembung, warna koloni putih, dan tepi koloni tidak rata. Berdasarkan pengujian biokimia karakteristik fisiologi, hasil identifikasi gram negatif, pengamatan mikroskop sel berwarna merah dan bentuk sel batang, menghasilkan enzim katalase. Genus bakteri belum diketahui, berdasarkan bagan pada pedoman Schaad setelah dilakukan pengujian pertumbuhan koloni kuning di media YDC dan hasilnya negatif harus di uji selanjutnya pada media DIM.

Isolat S14, memiliki karakteristik morfologi koloni yaitu bentuk koloni bulat, permukaan cembung, warna koloni putih krem, dan tepi koloni tidak rata. Karakteristik fisiologi berdasarkan beberapa pengujian biokimia, hasil identifikasi gram negatif, memiliki sel merah dan batang, menghasilkan enzim katalase. Menurut Coplin dan Kado (2001) bakteri *Pantoea* sp memiliki gram negatif, bakteri anaerob fakultatif, dengan sel berbentuk batang. Pengujian koloni kuning

pada media YDC menghasilkan warna koloni berwarna kuning sehingga menunjukkan genus *Pantoea* sp.

4.5. Uji Antagonis secara *In vitro*

Pengujian antagonis 3 isolat bakteri yang berpotensi sebagai antagonis *R. solanacearum* dilakukan secara *In vitro* atau didalam laboratorium, dengan mengamati daya hambat/zona bening bakteri antagonis terhadap bakteri patogen. Perlakuan 3 bakteri antagonis tersebut mampu menunjukkan interaksi antagonis pada hari ke 2. Hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh yang nyata pada uji antagonis secara *In vitro* dari 3 isolat bakteri antagonis lolos seleksi terhadap bakteri *R. solanacearum*. Dari 3 isolat bakteri yang diuji antagonis secara *In vitro*, tiap bakteri menghasilkan zona hambat. Munculnya zona hambat ini mengindikasikan adanya mekanisme antibiosis dari 3 isolat bakteri tersebut (Muhibuddin *et al.*, 2018).

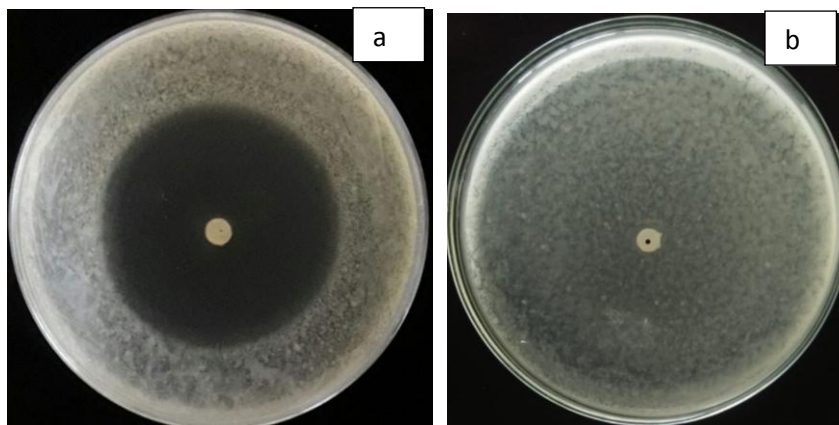
Senyawa antibiotik dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, sehingga pada media tidak terlihat masa bakteri di sekitar koloni bakteri antagonis. Hasil zona hambat bakteri antagonis dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Hasil pengujian antagonis

Perlakuan	Rata-rata indeks zona hambat bakteri antagonis terhadap <i>Ralstonia solanacearum</i> pada 2 hsi (cm)
<i>Xanthomonas</i> sp	0,905 b
S18	0,895 b
<i>Pantoea</i> sp	0,835 a

Keterangan : Bilangan disertai huruf yang berbeda menunjukkan sangat berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Hasil rata-rata indeks zona bening dari tabel diatas menunjukkan perlakuan tertinggi pada bakteri *Xanthomonas* sp yaitu sebesar 0,905 cm, indeks penghambatan terbesar kedua isolat kode S18 yaitu 0,895 cm, sedangkan hasil perlakuan terendah yaitu pada bakteri *Pantoea* sp yaitu 0,835 cm. Pada perlakuan kontrol tidak muncul adanya zona hambat, yang membuktikan tidak adanya pengaruh pemberian aquades pada bakteri patogen. Berarti aquades tidak memiliki potensi antagonis terhadap bakteri patogen *R. solanacearum*, yang mana aquades tidak dapat menghasilkan antibiosis untuk menghambat patogen. Perlakuan kontrol tujuannya untuk membandingkan dengan perlakuan bakteri, dan mengamati kemampuan dari bakteri terseleksi dalam menghambat patogen. Aktivitas penghambatan bakteri antagonis terhadap *R. solanacearum* dapat dilihat pada gambar 21.



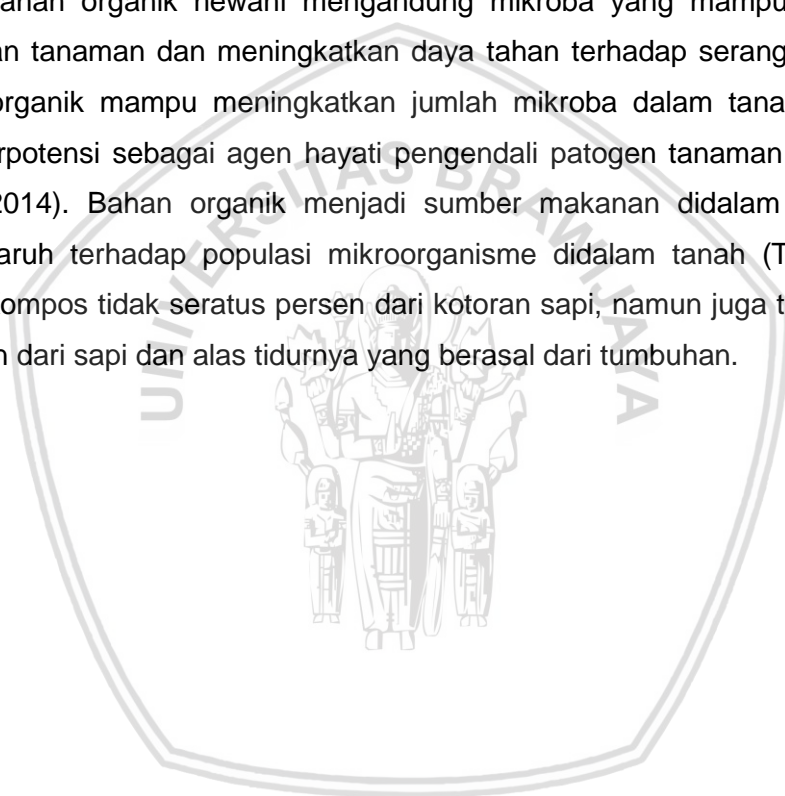
Gambar 21. Hasil uji bakteri antagonis terhadap *R. solanacearum*, a) Zona hambat bakteri antagonis, b) Kontrol menggunakan aquades

Perbedaan penghambatan setiap bakteri terjadi karena senyawa antibiosis yang dihasilkan setiap bakteri berbeda (Raharini *et al.*, 2012). Antibiosis merupakan senyawa yang dihasilkan oleh suatu mikroba untuk menghambat mikroorganisme lainnya (Pal, 2006). Isolat bakteri S20 yaitu merupakan genus *Pantoea* sp, yang mana dari genus bakteri ini ada yang merupakan bakteri antagonis pada patogen tanaman. Menurut Rezzonico *et al.* (2009) bakteri *Pantoea agglomerans* salah satu agen biokontrol yang ampuh untuk mengendalikan bakteri atau jamur patogen. Bakteri *Pantoea* sp dalam menghambat patogen tanaman mengeluarkan senyawa antibiosis, senyawa antibiosis yang dihasilkan oleh *Pantoea* sp yaitu herbicolins, pantocin, microcin (Dutkiewicz *et al.*, 2016). Berdasarkan pada penelitian Kuswinanti *et al.* (2014) yaitu uji antagonis bakteri yang berasal dari kompos kerbau belang didapatkan genus bakteri *Pantoea* sp yang mampu menghambat patogen *R. solanacearum*. selain itu bakteri antagonis dari genus *Pantoea* sp mampu menghambat patogen *Fusarium oxysporum* (Mahartha *et al.*, 2013).

Isolat bakteri S13 setelah pengujian identifikasi, teridentifikasi bahwa genus dari bakteri ini adalah *Xanthomonas* sp. Bakteri ini bersifat Gram negatif, aerob, katalase positif, metabolisme oksidatif dari glukosa dan menghasilkan pati. Namun berdasarkan Agrios (2005) bakteri *Xanthomonas* sp merupakan bakteri patogen tanaman dan berasosiasi hanya dengan tanaman atau bahan organik. Namun pada penelitian Vauterin *et al.* (1996) dilakukan identifikasi 70 bakteri *Xanthomonas* non pathogen menggunakan SDS-PAGE protein database. Berdasarkan penelitian tersebut telah teridentifikasi beberapa spesies yang merupakan bukan patogen yaitu *X. arboricola*, *X. translucens*, dan *X. hortorum*. Sesuai dengan pengujian hypersensitif yang mereka lakukan pada tanaman

tembakau, tomat, dan tanaman lada tidak muncul gejala penyakit sehingga menyimpulkan bahwa *X. arboricola* pathovar *agraria* bukan merupakan patogen. Spesies *X. arboricola* yaitu bakteri yang berasosiasi dengan tanaman, beberapa strain spesies bakteri ini menyebabkan penyakit pada tanaman herba dan kayu. Selain itu beberapa strain lainnya telah teridentifikasi sebagai non-patogen (Cambronerio *et al.*, 2016).

Dengan ditemukannya bakteri antagonis dalam kompos sapi, membuktikan bahwa dalam kompos tersebut terdapat mikroba yang bermanfaat bagi tanaman. Hal ini sejalan dengan pernyataan Suwahyono (2011) bahwa dalam bahan organik hewani mengandung mikroba yang mampu melindungi perakaran tanaman dan meningkatkan daya tahan terhadap serangan patogen. Bahan organik mampu meningkatkan jumlah mikroba dalam tanah, termasuk yang berpotensi sebagai agen hayati pengendali patogen tanaman (Kuswinanti *et al.*, 2014). Bahan organik menjadi sumber makanan didalam tanah, dan berpengaruh terhadap populasi mikroorganisme didalam tanah (Tanzil *et al.*, 2015). Kompos tidak seratus persen dari kotoran sapi, namun juga terdapat sisa makanan dari sapi dan alas tidurnya yang berasal dari tumbuhan.



V. PENUTUP

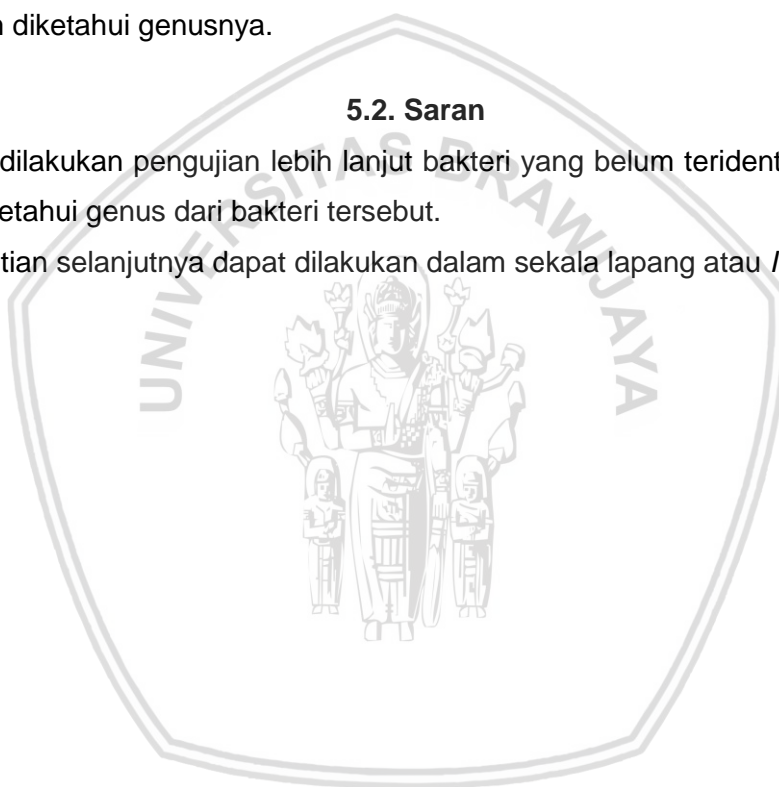
5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Eksplorasi bakteri antagonis kompos sapi, ditemukan 3 bakteri yang berpotensi menghambat *R. solanacearum* secara *In vitro*. Perlakuan antagonis dari ketiga bakteri mampu secara nyata dalam menghambat patogen *R. solanacearum*.
2. Bakteri kompos sapi yang berpotensi sebagai antagonis secara *In vitro*, termasuk kedalam genus *Pantoea* sp, *Xanthomonas* sp, dan satu bakteri belum diketahui genusnya.

5.2. Saran

1. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut bakteri yang belum teridentifikasi, untuk mengetahui genus dari bakteri tersebut.
2. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dalam skala lapang atau *In vivo*.



DAFTAR PUSTAKA

- Adam, S. 1995. Dasar-Dasar Mikrobiologi dan Parasitologi Untuk Perawat. Penerbit Buku Kedokteran EGC : Jakarta. 115 hlm.
- Anitha, K., Gunjotikar, G. A., Chakrabarty, S. K., Singh, S. D., Babu, S. B., Prasada, R. D. V. J., Rao, dan Varaprasad, K. S. 2003. Interception of bacterial wilt, *Burkholderia solanacearum* in groundnut germplasm imported from Australia. J. Of Oilseeds Res. 20: 100-104.
- Astiko, W., Sastrahidayat, I. R., Djauhari, S. dan Muhibuddin, A. 2013. The Role of Indigenous Mycorrhiza in Combination with Cattle Manure in Improving Maize Yield (*Zea Mays* L) on Sandy Loam of Northern Lombok, Eastern of Indonesia. J trop soils. 18 (1): 53-58.
- Cambronero, J. G., Bielsa, A. P., Lopez, M. M. dan Cubero, J. 2016. Comparative Genomic and Phenotypic Characterization of Pathogenic and Non-Pathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Reveals Insight into Infection Process of Bacterial Spot Disease of Stone Fruits. Plos one. 10.
- Chaudhry, Z dan Rashid, H. 2011. Isolation and Characterization of *Ralstonia Solanacearum* from Infected Tomato Plants of Soan Skesar Valley of Punjab. Pak J Bot. 43 (6).
- Chatrri, M. 2016. Pengantar Penyakit Ilmu Tumbuhan. Jakarta : Kencana.
- Coplin, D.L., dan Kado, C.I. 2001. *Pantoea* : Laboratory Manual for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. N. Schaad, J. Jones, and W.Chun.eds. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN. Hlm 73-83
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M. dan Milanowski, J. 2016. *Pantoea agglomerans* : a Mysterious Bacterium of Evil and Good. Part IV. Beneficial Effects. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 23 (2).
- Fanani, A. K., Abadi, A. L. dan Aini, L. Q. 2015. Eksplorasi Bakteri Patogen Pada Beberapa Spesies Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes* sp.). Jurnal HPT. 3 (3): 104-110.
- Fifendy, M., dan M. Biomed. 2017. Mikrobiologi. Kencana : Depok. 226 hlm.
- Fitri, L. dan Yasmin, Y. 2011. Isolasi dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi. Biologi Edukasi. 3 (2): 20-25.
- Hakim, N., Nyakpa, M.Y., Lubis, A.M., Nugroho, S.G., Diha, M.A., Hong, G.B. dan Bailey, H. H. 1986. Dasar -Dasar Ilmu Tanah Universitas Lampung. 488 hal.
- Hasanuddin. 2003. Peningkatan Peranan Mikroorganisme Dalam Sistem Pengendalian Penyakit Tumbuhan Secara Terpadu. USU Digital Library.

- Hemraj, V., Diksha, S. dan Avneet, G. 2013. A review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of Life Science*. 1 (1):1-7.
- Hidayah, N. dan Djajadi. 2009. Sifat-sifat Tanah yang Mempengaruhi Perkembangan Patogen Tular Tanah pada Tanaman Tembakau. *Perspektif*. 8 (2): 74-83.
- Hidayat, R dan Alhadi, F. 2012. Identifikasi *Streptococcus Equi* dari Kuda yang Diduga Menderita Strangles. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. 17 (3): 199-203.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. dan Williams, S. T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Maryland, USA: Williams and Wilkins.
- Huang, Q. dan Allen, C. 2000. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants. *Physiology Molecular Plant Pathology*. 57:77-83.
- Kusuma, R. R., Aini, L. Q., Khoirunnisa, L. 2016. Kajian Mikroba Rizosfer di Kawasan Pertanian Organik Kebun Percobaan Cangar. *Seminas Nasional Pembangunan Pertanian*.
- Kuswinanti, T., Baharuddin. dan Sukmawati, S. 2014. Efektivitas Isolat Bakteri dari Rizosfer dan Bahan Organik Terhadap *Ralstonia solanacearum* dan *Fusarium oxysporum*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 10 (2): 68-72.
- Mahartha, K. A., Khalimi, K. dan Wirya, G. A. S. 2013. Uji Efektivitas Rizobakteri sebagai Agen Antagonis terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *capsici* Penyebab Penyakit Layu Fusarium pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.). *E-jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 2 (3): 145-154.
- Masnilah, R., Abadi, A. L., Astono, T. H. dan Aini, L. Q. 2013. Karakteristik Bakteri Penyebab Penyakit Hawar Daun Edamame Di Jember. *Berkala Ilmiah Pertanian*. 1 (1): 10-14.
- Mohamed, R., Groulx, E., Defilippi, S., Erak, T., Tambong, J. T., Tweddell, R. J., Tsopmo, A. dan Avis, T. J. 2017. Physiological and molecular characterization of compost bacteria antagonistic to soil-borne plant pathogens. *Can j microbiol*. 63 (5): 411-426
- Muhibuddin, A., Addina, L., Abadi, A. L. and Ahmad, A. 2011. Biodiversity of Soil Fungi On Integrated Pest Management Farming System. *Agivita*. 33 (2).
- Muhibuddin, A., Fadilah, S., Sektiono, A. W., Qomariyah, U. K. N., Faizah, M., Susanti, A. dan Nurhatika, S. 2018. Yeast from Epiphyte of Avocadoes to Control *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Anthracnose Disease. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 10 (2).
- Muwarni, S. 2015. *Dasar- Dasar Mikrobiologi Veteriner*. UB Press : Malang. 356 hlm.

- Nasrun., Christanti., Arwiyanto, T. dan Mariska, I. 2007. Karakteristik Fisiologis *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Nilam. Jurnal Littri. 13 (2): 43-48.
- Nurdiansyah, A. 2008. Biologi untuk Kelas X Semester 1 Sekolah Menengah Atas. Bandung : Grafindo Media Pratama.
- Pal, K. K. dan B. Mc Spadden, Gardener. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. 5: 2-5.
- Pratiwi, R. 2005. Perbedaan Daya Hambat terhadap Streptococcus mutans dari Beberapa Pasta Gigi yang Mengandung Herbal. Journal Dentist. 38 (2): 64-67.
- Purwohadisantoso, K., Zubaidah, E. dan Saparianti, E. 2009. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Sayur Kubis yang Memiliki Kemampuan Penghambatan Bakteri Patogen (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella thypimurium*). Jurnal Teknologi Pertanian. 10 (1): 19-27.
- Raharini, A. O., Kawuri, R., dan Khalini, K. 2012. Penggunaan *Streptomyces* sp. sebagai Biokontrol Penyakit Layu pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annuum* L.) yang Disebabkan Oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *capsici*. Fakultas Pertanian Universitas Udayana. 2 (2): 155.
- Rahman, M. M., Khan, A. A. dan Ali, M. E. 2013. Screening of Antagonistic Bacteria against Bacterial Wilt of Tomato Eggplant and Potato in Bangladesh. Int. J. Agri. Biol. 15: 973-977.
- Rai, R., Srinivasamurthy, R., Dash, P. K. dan Gupta, P. 2017. Isolation, characterization and evaluation of the biocontrol potential of *Pseudomonas protegens* RS-9 against *Ralstonia solanacearum* in Tomato. Indian Journal of Experimental Biology. 55.
- Rezzonico, F., Smith, T., Montesinos, E., Frey, J. E. dan Duffy, B. 2009. Genotypic Comparison of *Pantoea agglomerans* Plant and Clinical Strains. BMC Microbiology.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogen Bacteria. Ed ketiga. APS Press. St Paul Minnessota.
- Sharma, A., Diwevidi, V. D., Singh. S., Pawar, K. K., Jerman, M., Singh, L. B., Singh, S. dan Srivastawa, D. 2013. Biological Control and its Important in Agriculture. International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research. 4 (3): 175-180.
- Shivas, R dan Beasley, D. 2005. Pengelolaan Koleksi Patogen Tanaman Departemen Pertanian, Perikanan dan Kehutanan Pemerintah Australia (Departement of Agriculture, Fisheries and Forestry, DAFF). <http://daff.gov.au>.

- Suwahyono, U 2011. Petunjuk Praktis Penggunaan Pupuk Organik Secara Efektif dan Efisien. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tanskersten, J., Huang, H. dan Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology*. 183 (12).
- Tanzil, A. I., Muhibuddin, A. dan Djauhari, S. 2015. Eksplorasi Jamur Tanah Pada Rizosfir Tomat di Lahan Endemis dan Non Endemis *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Jurnal HPT*. 3 (1)
- Tjahjadi, N. 1998. Hama dan Penyakit Tanaman. Kanasius : Yogyakarta.
- Vauterin, L., Yang, P., Alvarez, A., Takikawa, Y., Roth, D. A., Vidaver, A. K., Stall, R. E., Kersters, K. dan Swings, J. 1996. Identification of Non-Pathogenic *Xanthomonas* Strains Associated with Plants. *Microbiol*. 19.
- Wardhika, C. M., Suryanti. dan Joko, T. 2014. Eksplorasi Bakteri yang Mampu Sebagai Agens Pengendali Hayati *Fusarium solani* dan *Meloidogyne incognita* Pada Lada. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 18 (2): 89-94.
- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. E. dan Liu, Y. 2014. Antgaonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *Plos one*. 9 (3)

